

**„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.“**

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Milan Lokvenc**

Přestavby genů pro imunoglobuliny a sledování minimální reziduální nemoci  
u B-lymfoproliferativních onemocnění.

Immunoglobulin genes rearrangement and minimal residual disease monitoring  
in B-lymphoproliferative diseases.

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Markéta Kalinová, Ph.D.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 7. 5. 2012

Milan Lokvenc

Tato diplomová práce byla vypracována na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol v Laboratoři molekulární patologie v letech 2010 - 2012 z finanční podpory následujícího grantu.

VÝZKUMNÝ ZÁMĚR MZ0 FNM 2005/6704

### **Poděkování:**

Tato diplomová práce byla vypracována v Laboratoři molekulární patologie Ústavu patologie a molekulární medicíny, 2. LF Univerzity Karlovy v Praze.

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Markétě Kalinové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a pomoc v průběhu zpracování této diplomové práce. Neméně bych chtěl poděkovat Prof. MUDr. Romanu Kodetovi, CSc. za jeho rady a za možnost vypracovat svoji diplomovou práci na tomto pracovišti. Velké díky patří také celému kolektivu Laboratoře molekulární patologie FN Motol za pomoc při řešení obtíží v laboratoři a za vždy dobrou náladu.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni za podporu a pochopení.

## **Abstrakt:**

Maligní lymfomy jsou nádorová onemocnění, která vznikají klonální proliferací lymfocytů zastavených v určitém stupni diferenciace. Všechny nádorové buňky vzniklé z původního klonu tedy sdílejí stejné charakteristiky a toho je možno využít při jejich detekci. Nalezení vhodných molekulárních znaků nádorových buněk je základním krokem nejen pro diagnostiku onemocnění, ale také pro sledování minimální reziduální nemoci. Minimální reziduální nemoc je definována jako subklinická úroveň nemoci, kdy v průběhu terapie již maligní buňky nejsou běžnými cytologickými metodami detekovatelné. Právě tyto reziduální buňky, které unikly léčbě, mohou způsobit relaps onemocnění.

Hlavní cíle diplomové práce jsou detekce a analýza přestaveb genů pro imunoglobuliny a chromozomální translokace t(11;14) v oblasti MTC, a zavedení a optimalizace RQ-PCR systému pro detekci minimální reziduální nemoci. Kvantifikace klonálních přestaveb popřípadě chromozomální translokace umožňuje detekci hladiny minimální reziduální nemoci u pacientů s maligními lymfomy.

U 19 pacientů s maligními lymfomy byly analyzovány klonální přestavby genů pro imunoglobuliny, respektive charakteristická chromozomální translokace. Byly analyzovány jednotlivé genové segmenty, přechodové oblasti a kombinační variabilita v cílových přestavbách imunoglobulinových genů. Byl zaveden a optimalizován pacient specifický RQ-PCR systém, který u 12 pacientů umožnil sledování minimální reziduální nemoci. U pacientů s chromozomální translokací t(11;14) v oblasti MTC byly detekovány hladiny minimální reziduální nemoci pomocí dvou nezávislých molekulárních cílů a bylo zjištěno, že získaná data spolu vzájemně korelují.

Molekulární metody detekce a kvantifikace klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny, respektive chromozomální translokace, umožňují nejen diagnostiku onemocnění, ale také sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s maligními lymfomy.

**Klíčová slova:** minimální reziduální nemoc; maligní lymfoproliferace; lymfom pláštěvých buněk; folikulární lymfom; V(D)J rekombinace; imunoglobulinový gen; RQ-PCR

## **Abstract:**

Malignant lymphomas are tumors arising by clonal proliferation of lymphocytes stopped at a specific stage of differentiation. All tumor cells arising from the original clone thus share the same characteristics and that can be used in their detection. Finding a suitable molecular marker of tumor cells is an essential step not only to disease diagnosis, but also for monitoring of minimal residual disease. Minimal residual disease is defined as the subclinical disease level, which malignant cells are not detectable for conventional cytological methods during the therapy. These residual cells can cause relapse.

The main goals of the diploma thesis are a detection and analysis of immunoglobulin genes rearrangement and chromosomal translocation t(11; 14) in the MTC region, and a development and optimization of RQ-PCR system for detection of minimal residual disease. Quantification of clonal rearrangement or chromosomal translocation allows the detection of minimal residual disease level in patients with malignant lymphomas.

Clonal immunoglobulin genes rearrangement or characteristic chromosomal translocation were analyzed in 19 patients with malignant lymphomas. There were analyzed individual gene segments, N-region and combination variability in immunoglobulin genes rearrangement. There was developed and optimized RQ-PCR system specific for each individual patient. The developed methodology allowed monitoring of minimal residual disease in 12 patients. Minimal residual disease levels were detected by using two independent molecular targets in patients with chromosomal translocation t(11; 14) in the MTC region. These obtained results correlated with each other.

Molecular methods for detection and quantification of clonal immunoglobulin genes rearrangement, or chromosomal translocation, serve not only to diagnosis of disease, but also to monitoring of minimal residual disease in patients with malignant lymphomas.

**Keywords:** minimal residual disease; malignant lymphoproliferations; mantle cell lymphoma; follicular lymphoma; V(D)J recombination; immunoglobulin gene; RQ-PCR

## Seznam zkratk:

AKT	serin threoninová protein kináza
ALB	albumin
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
APC	antigen prezentující buňky
APRIL	"proliferation-inducing ligand"
APS	amonium persulfát
ARF	"alternate reading frame" protein tumorsupresorového genu ARF
ASCT	autologní transplantace kmenových buněk
ATM	"ataxia telangiectasia mutated"
BAFF	"B cell activating factor"
BC	buffy coat
bcl-2, bcl-6	geny rodiny bcl (B-cell lymphoma)
BCMA	"B cell maturation antigen"
BCR	B-buněčné receptory
BL	Burkittův lymfom
BMSC	stromální buňky kostní dřeně
B-NHL	non-Hodgkinské lymfomy B řady
BSA	bovinní sérový albumin
Btk	"Bruton's tyrosine kinase"
CCND1	gen kódující cyklin D1
CD	"cluster of differentiation"
CDK	cyklin dependentní kináza
CDKN2A	"cyclin-dependent kinase inhibitor 2A"
CDT1	"chromatin licensing and DNA replication factor 1"
CLL/SLL	chronická lymfocytická leukémie / malobuněčný lymfocytický lymfom
CML	chronická myeloidní leukémie
c-Myc	buněčný proto-onkogen z rodiny Myc
CTLA-4	"cytotoxic T-lymphocyte antigen 4"
CTRL	"control" kontrolní geny
CXCR5	"C-X-C chemokine receptor type 5"
DLBCL	difuzní velkobuněčný B-lymfom
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PKcs	katalytická podjednotka DNA dependentní protein kinázy
E2F	rodina eukaryotních transkripčních faktorů
EBV	virus Epsteina a Baarové

ESG-MRD-ALL	European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia
FDC	folikulární dendritické buňky
FISH	fluorescent in-situ hybridization
FL	folikulární lymfom
FoxP3	"forkhead box P3" protein rodiny FOX
GC	germinální centrum
HDA	heteroduplexní analýza
Ch1, Ch2	checkpoint 1, checkpoint 2
Igα; Igβ	transmembránové řetězce povrchového imunoglobulinu
IgH	těžký řetězec imunoglobulinu
IgK	kappa řetězec imunoglobulinu
IgL	lambda řetězec imunoglobulinu
IL-21	interleukin 21
INK4a/ARF	genový lokus pro proteiny p16 a ARF
KD	kostní dřeň
LAM	lymfom podporující makrofágy
LPL	lymfoplazmocytický lymfom
MALT	"mucosa associated lymphoid tissue"
MargZ	marginální zóna
MCL	lymfom z pláštěvých buněk
MDM2	negativní regulátor p53
MM	mnohočetný myelom
MRN	minimální reziduální nemoc
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MSC	mezenchymální kmenové buňky
MTC	hlavní translokační klast
mTOR	"mammalian target of rapamycin"
MZ	plášťová zóna
NF-κB.	nukleární faktor kappa B
NHEJ	"non-homologous end-joining"
NHL	non-Hodgkinské lymfomy
NK	"natural killers"
p	krátké raménko chromozomu
p15	protein 15
p16	protein 16
p27 <sup>Kip1</sup>	CDKN1B "Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B"
p53	protein 53
PBS	"phosphate buffered saline"
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI3K	"phosphatidylinositol 3-kinase"
PK	periferní krev
q	dlouhé raménko chromozomu
QR	rozmezí kvantifikace



RAG1	"recombination activating genes 1"
RB	retinoblastomový protein
RNA	ribonukleová kyselina
RQ-PCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RQ-RT-PCR	kvantitativní PCR v reálném čase s použitím reverzní transkripce
RSS	rekombinační signální sekvence
S	senzitivita
Src	proto-onkogen kódující tyrozin kinázu z rodiny Src
Syk	"spleen tyrosine kinase" "transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor"
TACI	
Tax	hlavní virový protein T-lymfotropního viru 1
TBE pufr	"Tris/Borate/EDTA" pufr
TCR	T-buněčné receptory
TdT	terminální deoxynukleotidyl transferáza
T <sub>FH</sub>	folikulární pomocné T-buňky
TLR	"Toll-like" receptory
T <sub>m</sub>	teplota tání
Treg	regulační T-lymfocyty
VCAM	"vascular cell adhesion molecule 1"
VLA-4	"very late antigen-4"
WHO	Světová zdravotnická organizace
Wnt	signalizační dráha zúčastněná při karcinogenezi
XRCC4	"X-ray repair cross-complementing protein 4"

## **Obsah:**

<b>1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>10</b>
<b>2. PŘEHLED LITERATURY .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Maligní lymfomy .....</b>	<b>12</b>
2.1.1. Klasifikace, epidemiologie a etiologie NHL.....	12
2.1.2. Molekulární patogeneze NHL .....	14
2.1.3. Lymfom z plášťových buněk.....	19
2.1.3.1. Molekulární patologie MCL .....	19
2.1.3.2. Role t(11;14) a cyklinu D1 u MCL.....	20
2.1.3.3. Genetická nestabilita u MCL.....	21
2.1.3.4. Význam mikroprostředí a jeho interakcí s MCL.....	24
<b>2.2. Genová variabilita imunoglobulinů při vývoji B-lymfocytů .....</b>	<b>27</b>
2.2.1. Imunoglobuliny a receptory B-lymfocytů .....	27
2.2.2. Přestavby imunoglobulinových genů B-lymfocytů .....	29
2.2.2.1. Uspořádání genů kódující imunoglobuliny .....	29
2.2.2.2. Mechanismus V(D)J rekombinace .....	30
2.2.3. Diferenciace B-lymfocytů.....	33
<b>2.3. Minimální reziduální nemoc .....</b>	<b>35</b>
2.3.1. Kvantitativní metody sledování MRN.....	36
<b>3. MATERIÁL .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Pacienti .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Roztoky a chemikálie.....</b>	<b>42</b>
3.2.1. Roztoky a chemikálie použité při izolaci buněk z PK či KD osmotickou lýzou.....	42
3.2.2. Roztoky a chemikálie použité při izolaci DNA ze zmražené tkáně.....	42
3.2.3. Roztoky a chemikálie použité při izolaci DNA z parafinových bloků .....	42
3.2.4. Roztoky a chemikálie použité na elektroforézu .....	43
3.2.5. Roztoky a chemikálie použité při PCR .....	43
3.2.6. Roztoky a chemikálie použité na přečištění produktů PCR .....	44
3.2.7. Roztoky a chemikálie použité při sekvenaci DNA a přečištění.....	44
3.2.8. Roztoky a chemikálie použité při optimalizaci RQ-PCR systému .....	44
<b>3.3. Použitá laboratorní technika.....</b>	<b>45</b>
<b>3.4. Přehled použitých primerů a hydrolyzačních sond .....</b>	<b>46</b>

<b>4. METODIKA.....</b>	<b>48</b>
4.1. Izolace buněk z periferní krve či kostní dřeně osmotickou lýzou .....	48
4.2. Izolace nukleových kyselin (NK).....	49
4.2.1. Trizolová izolace DNA a RNA ze zmražené tkáně a jaderných buněk .....	49
4.2.1.1. Trizolová izolace RNA .....	49
4.2.1.2. Trizolová izolace DNA .....	50
4.2.2. Izolace DNA z tkáně fixované ve formolu/ethanolu a zalité v parafinových blocích .....	51
4.3. Gelová elektroforéza.....	52
4.3.1. Agarózový gel.....	52
4.3.2. Polyakrylamidový gel .....	52
4.4. Amplifikace kontrolních genů CTRL metodou PCR .....	53
4.5. Detekce translokace t(11;14) a klonality přestaveb genů IgH a IgK.....	54
4.6. Heteroduplexní analýza.....	59
4.7. Přečištění produktů PCR .....	60
4.8. Sekvenační reakce a přečištění produktů sekvenace .....	60
4.9. Vyhodnocení sekvenace a návrh klonálně specifických primerů .....	62
4.10. Optimalizace RQ-PCR systému a detekce MRN .....	64
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>68</b>
5.1. Detekce klonality a translokace t(11;14) v oblasti MTC .....	68
5.2. Analýza přestaveb genů pro IgH a zastoupení jednotlivých rodin V, D, J segmentů .....	70
5.3. Návrh klonálně specifických primerů.....	75
5.4. Sledování hladiny MRN a optimalizace systému.....	78
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>86</b>
<b>7. SOUHRN.....</b>	<b>92</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>93</b>
<b>9. SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>102</b>

## **1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE**

Maligní lymfomy jsou nádorová onemocnění, která vznikají patologickou proliferací buněk krve tvorného systému, zastavených v některé fázi svého vývoje. Maligní lymfomy tvoří heterogenní skupinu nádorů a patří mezi lymfoproliferativní onemocnění. Lymfoproliferativní onemocnění zahrnují širokou škálu chorob od benigních až po vysoce maligní. Diagnostika však bývá často obtížná díky histologické a biologické rozmanitosti lymfoproliferativních chorob, a proto je nezbytné nalezení vhodných diagnostických a prognostických znaků. Molekulární diagnostika maligních lymfoproliferací je založena na detekci klonálního původu nádorových buněk. Právě klonální přestavby receptorových genů či chromozomální translokace jsou vhodné diagnostické markery pro detekci nádorových buněk.

Molekulární analýza specifických přestaveb genů kódujících imunoreceptory neslouží jen k diagnostice, ale také k identifikaci cílů pro detekci minimální reziduální nemoci (MRN). Specifické přestavby imunoreceptorů umožňují návrh klonálně specifických systémů, které jsou nezbytné pro sledování MRN pomocí kvantitativního PCR (RQ-PCR). Analýza sekvencí přestaveb umožňuje určit zastoupení jednotlivých V(D)J segmentů a přechodových oblastí a jejich vzájemné uspořádání a polohu v cílové sekvenci. Stejně jako specifické přestavby genů pro imunoreceptory, lze použít k detekci MRN také chromozomální translokace, charakteristické pro některé maligní lymfomy. Právě nález těchto charakteristických molekulárních změn má pro pacienta obrovský význam nejen v diagnostice, ale i v případě sledování MRN a predikci relapsu onemocnění.

MRN je definována jako subklinická úroveň nemoci, kdy v průběhu terapie již maligní buňky nejsou běžnými cytologickými metodami detekovatelné. V této situaci se pacient nachází v kompletní klinické remisi, přesto se však v jeho těle může vyskytovat až  $10^{10}$  maligních elementů. Právě tyto zbytkové (reziduální) buňky, které unikly léčbě, mohou způsobit relaps onemocnění. Sledování MRN poskytuje informace o dynamice nádorového onemocnění a umožňuje sledovat přírůstek či úbytek nádorových buněk v určitém časovém horizontu. Sledování MRN je významné pro přesnější stratifikaci pacientů při začlenění do léčebných protokolů. Rozdělení pacientů je zaměřeno především na účinnější terapii u pacientů s vysokým rizikem relapsu a redukci léčby u pacientů s nízkým rizikem relapsu, kterým by mohly následně hrozit

sekundární malignity, vyvolané terapií. Tyto postupy jsou již zavedeny u některých typů leukémií, nicméně u mnoha ostatních lymfoproliferativních onemocnění je detekce MRN stále ve fázi výzkumu. Předpokládá se, že sledování hladiny MRN by mohlo být významným prognostickým faktorem při léčbě těchto onemocnění.

Cílem diplomové práce bylo, kromě osvojení praktických dovedností v laboratoři, přispět k zavedení a optimalizaci systému pro diagnostiku a sledování MRN a zároveň poukázat na význam sledování MRN u pacientů s maligními lymfomy.

#### **Cíle:**

- 1. Molekulární diagnostika lymfoproliferativních onemocnění.**
- 2. Analýza klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny, respektive translokace t(11;14) v oblasti MTC a výběr vhodných cílů pro sledování MRN.**
- 3. Návrh klonálně specifických primerů a optimalizace detekce MRN dle kritérií ESG-MRD-ALL (EURO-MRD).**
- 4. Sledování MRN u pacientů s maligními lymfomy.**

## **2. PŘEHLED LITERATURY**

### **2.1. Maligní lymfomy**

Maligní lymfomy jsou nádorová onemocnění lymfatické tkáně vznikající klonální proliferací lymfocytů. Podle buněčného typu zasaženého nádorovou transformací rozdělujeme lymfomy na B-buněčné, T-buněčné a vzácně dochází ke vzniku lymfomů také z NK-buněk (přirození zabíječi, natural killers). Lymfocyty patří mezi buňky imunitního systému, které se vyvíjí lymfoidní řadou z hematopoetické kmenové buňky. Diferenciace lymfocytů z kmenových buněk je složitý proces řízený a koordinovaný expresí mnoha genů. V primární lymfoidní tkáni, kterou je kostní dřeň a thymus, dochází ke vzniku, diferenciaci a zrání lymfoidních buněk. Ty následně migrují do sekundárních lymfoidních tkání, kde zajišťují hlavní fáze antigenně specifických imunitních reakcí. Během diferenciace lymfocytů dochází ke změnám buněčných vlastností a mechanismů lymfoidních buněk, které jsou výsledkem změny genové exprese. Obdobně jako u většiny malignit může během těchto událostí docházet k hromadění genetických poškození, která vedou k aktivaci proto-onkogenů či narušení normální funkce tumor supresorových genů, což má za následek nádorovou transformaci a vznik nádoru (Dalla-Favera, Gaidano, 2001).

#### **2.1.1. Klasifikace, epidemiologie a etiologie NHL**

Základní rozdělení lymfomů je na Hodgkinův lymfom a non-Hodgkinské lymfomy (NHL). NHL představují různorodou skupinu nádorů primárně postihujících lymfatické uzliny, avšak v řadě případů vykazují také mimouzlinové lokalizace. V roce 2008 vydala Světová zdravotnická organizace (WHO) závaznou klasifikaci, která definuje jednotky nejen podle morfologie, ale také podle fenotypu a příslušnosti k vývojové buněčné linii, shrnuto v příloze č. 1. Maligní lymfomy jsou rozděleny na B-, T- a NK-lymfocytární linii. NHL B-řady (B-NHL) tvoří 80% všech lymfomů a mají obvykle příznivější průběh než lymfomy odvozené z T- či NK-linie (Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. a kol., 2008). B-NHL se rozdělují také dle klinického stádia na základě REAL klasifikace. Rozdělují se na nízké agresivní (indolentní) lymfomy, u kterých je medián přežití bez léčby řádově v letech. Do této skupiny může být zařazen například extranodální MALT-B-lymfom (mucosa associated lymphoid tissue) nebo lymfoplazmocytární lymfom. Další kategorií jsou agresivní lymfomy, které představují střední riziko. Jako příklad agresivního lymfomu je uváděn lymfom

z pláštěvých buněk - MCL (mantle cell lymphoma) či difuzní velkobuněčný B-lymfom - DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma). Poslední skupinou jsou velmi agresivní lymfomy, které představují vysoké riziko a medián přežití bez léčby je řádově v týdnech. Klasickým příkladem vysoce agresivního lymfomu je Burkittův lymfom (BL).

NHL představují pátý nejčastější zhoubný nádor populace na západní polokouli a jsou typickým onemocněním lidí staršího věku, medián se pohybuje kolem 60 let. Incidence NHL příkře stoupá po dosažení 50. roku života. I přes tato fakta se onemocnění nevyhýbá ani velmi mladým osobám. Zatímco ve věkové skupině 40-49 let dosahuje incidence NHL průměrně 8 nemocných na 100 000 obyvatel a rok, u populace starší 70 let incidence dosahuje 50–70 případů na 100 000 obyvatel. (Papajík et al., 2009). Z posledních výpočtů pravděpodobnosti výskytu nádorů v USA vyplývá, že NHL tvořily v roce 2008 téměř 5 % všech nádorů (více než 66 000 nových případů) a díky tomu představovaly 5. nejčastější maligní nádor s incidencí 22,8 případů na 100 000 obyvatel u mužů a 16,2 případů u žen (Jemal, Siegel et al., 2008). Epidemiologická data NHL pro Českou republiku z roku 2006 jsou shrnuty v příloze č. 2. Přehled a jednotlivé zastoupení maligních lymfomů je uveden v příloze č. 3.

Z pohledu etiologie jsou NHL multifaktoriálními onemocněními. Často se vyskytují s chronickými zánětlivými nemocemi a autoimunitními onemocněními. Například Sjögrenův syndrom je autoimunitní onemocnění, při němž imunitní buňky napadají a ničí exokrinní žlázy, které produkují slzy a sliny. Předpokládá se, že NHL mají vztah k tomuto syndromu, neboť riziko vzniku je 40x vyšší než u normální populace (Hoover, 1992). Rizikovým faktorem při vzniku lymfomů je také imunosuprese a to jak vrozená, tak i vyvolaná léky. Bylo prokázáno, že až u 25% pacientů s vrozenými imunodeficiencemi, jako jsou Wiskott-Aldrich syndrom či ataxia teleangiectasia, se během života vyvine nádor. V 50 % dochází k vývoji některého typu NHL. Obdobně dochází ke zvýšení incidence lymfomů u pacientů, kteří jsou pod imunosupresivní léčbou, především pacienti po transplantaci orgánů, ale též při léčbě maligních hematologických nemocí pomocí hematopoetické transplantace kmenových buněk (Adami et al., 2003).

Některé NHL jsou spojeny se specifickými virovými a bakteriálními infekcemi. Prvním případem je lidský T-lymfotropní virus typu 1, který patří mezi retroviry. Tento RNA virus způsobuje akutní leukémii T-buněk a lymfom T-buněk. Hlavní virový

protein Tax interaguje s buněčnými proteiny a dereguluje buněčné signální dráhy, čímž moduluje geny zodpovědné za řízení buněčného cyklu a apoptózu. Takovýmto působením navozuje proliferaci T-lymfocytů a spolu s deregulací tumor supresorových genů může vést k nádorové transformaci (Yasunaga, Matsuoka, 2007).

Jednou z nejznámějších virových infekcí spjatých s NHL je infekce virem Epsteinova a Baarové (EBV). EBV patří mezi herpesviry a je mohutně rozšířen po celém světě. Bylo potvrzeno, že EBV je hlavní kofaktor mnoha B-lymfoproliferativních malignit. Během primární infekce EBV dochází vlivem virových proteinů k imortalizaci B-lymfocytů, jejímž výsledkem je polyklonální aktivace a proliferace. Vysoká mitotická aktivita transformovaných buněk zvyšuje pravděpodobnost genetických mutací a zvyšuje riziko vzniku monoklonality B-lymfocytů se specifickou cytogenetickou přestavbou. Téměř ve 100% případech endemického Burkittova lymfomu je přítomen EBV.

Příkladem bakteriální infekce, která přispívá k nádorové transformaci, je infekce bakterií *Helicobacter pylori*. Chronický zánět žaludku způsobený infekcí vede k hromadění B-lymfocytů v submukóze žaludku. Navíc v těchto podmínkách dochází k oxidačnímu stresu a poškození lymfoidních a epitelálních buněk, což vede ke vzniku žaludeční formy MALT lymfomu.

Jistá role ve vzniku maligních lymfomů je přičítána také chemickým látkám a záření. Z chemických látek jsou to především pesticidy a insekticidy, organofosfáty, fungicidy a fumiganty (Müller et al., 2005).

### **2.1.2. Molekulární patogeneze NHL**

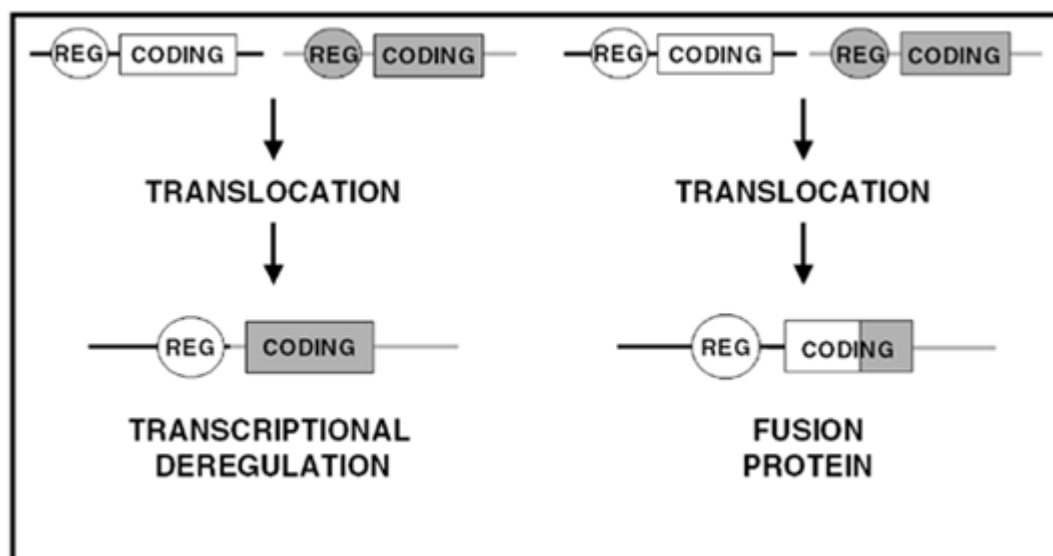
Předpokládá se a většina studií dokazuje, že vznik a vývoj nádoru je víceetapový proces, často označován pojmem „multiple-hit hypothesis“. Tento model předpokládá, že pro vznik nádoru je třeba několika genetických změn či abnormalit, které ovšem mohou být časově velmi vzdálené. Tyto genetické zásahy ovlivňují především kontrolu proliferace a diferenciace, DNA reparační mechanismy, apoptózu a mnoho jiných důležitých buněčných procesů (Nordling, 1953; Knudson, 1971; Hahn, Weinberg, 2002). Pro většinu nádorových onemocnění jsou charakteristické genetické změny, které vedou k aktivaci proto-onkogenů či inaktivaci tumor supresorových genů (Dall-Favera, Gaidano, 2001).



Nejčastějšími primárními genetickými alteracemi u NHL jsou chromozomové translokace. Tyto translokace jsou relativně specifické pro různé typy lymfomů a jejich identifikace je důležitá pro stanovení správné diagnózy. Většina translokací u NHL vede k aktivaci onkogenů dvěma různými způsoby, viz obrázek č. 1 a obrázek č. 2.

Nejčastější typ translokace vede k přenosu části chromozomu obsahující potenciální onkogen do regulační oblasti jiného genu. Zpravidla se jedná o geny s vysokou expresí, jakými jsou například geny pro těžké řetězce imunoglobulinů. V takovém případě se potenciální onkogen dostává pod silný promotor a dochází ke zvýšení jeho exprese oproti fyziologickému stavu. Rozeznáváme dva typy deregulace exprese proto-onkogenu. Prvním typem je homotypická deregulace, při níž je proto-onkogen v buňkách dané tkáně běžně exprimován, avšak v jiné míře než následně v nádoru. Při heterotypické deregulaci dochází k expresi proto-onkogenu v buňkách, které za fyziologických podmínek tento gen neexprimují.

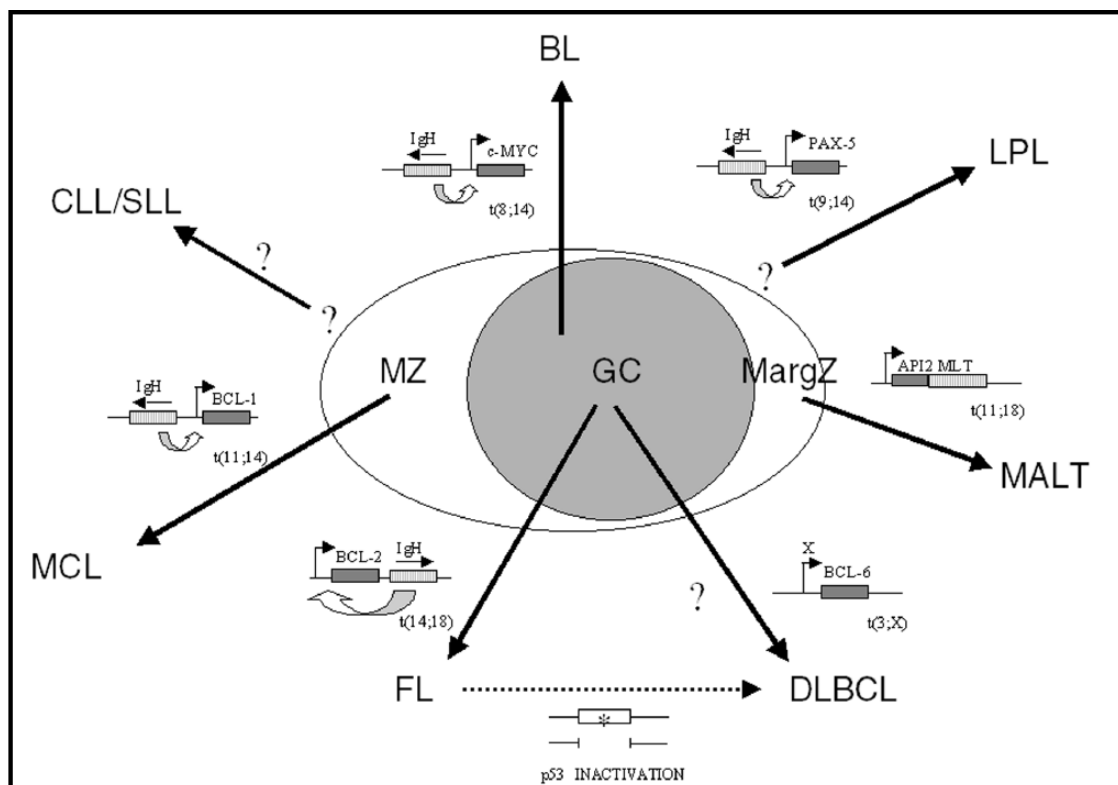
Druhým typem je translokace, při níž dochází k tvorbě fúzních genů. Tyto fúzní geny vznikají spojením částí dvou různých genů v místě zlomu chromozomu. Produktem fúzních genů jsou chimérické proteiny s různými vlastnostmi, které závisí na typu fúzních partnerů. Odlišné mechanismy translokací u NHL jsou znázorněny na obrázku č. 1.



**Obr. č. 1 Model chromozomálních translokací u NHL. Upraveno dle Harris et al., 2001.**

V levé části obrázku je znázorněna chromozomální translokace, při které dochází k přenosu jednoho genu pod promotor jiného genu. Druhé schéma znázorňuje translokaci, při které dochází k fúzi genů. Takový fúzní gen pak kóduje fúzní protein.

Patogenetická role chromozomálních translokací je demonstrována v transformačních studiích na transgenních zvířecích modelech. Tyto studie poukazují na to, že chromozomální translokace přispívají ke vzniku lymfomů, nicméně nejsou dostatečné k jejich vytvoření. Především nahromadění mnoha genetických abnormalit vede k tumorigenezi (Harris et al., 2001). V následujících odstavcích jsou uvedeny nejčastější patologické mechanismy, které vysvětlují molekulární příčinu vzniku některých NHL. V příloze č. 4 je uveden přehled některých translokací u NHL.



**Obr. č. 2 Model histogeneze a patogeneze u B-NHL. Převzato z Harris et al., 2001.**

Na obrázku je znázorněn lymfoidní folikul, který se skládá z germinálního centra (GC), plášťové zóny (MZ) a marginální zóny (MargZ). Na základě přítomnosti somatických mutací genů pro variabilní domény imunoglobulinových řetězců (IgV), rozlišujeme NHL na dvě skupiny:

**A)** NHL odvozené z pre-GC, které postrádají proces somatických mutací. Do této skupiny patří například lymfom z plášťových buněk (MCL).

**B)** NHL odvozené z buněk diferenciovaných v GC, kde tyto buňky prošly procesem somatických mutací Ig genů. Do této kategorie patří folikulární lymfom (FL), lymfoplazmocytický lymfom (LPL), MALT lymfom, velkobuněčný difúzní B-lymfom (DLBCL) a Burkittův lymfom (BL).

U chronické lymfocytické leukémie/malobuněčného lymfocytického lymfomu (CLL/SLL) dochází k procesu somatických mutací v genech pro Ig pouze v 50% případů. Proto jsou vyčleněny z těchto dvou charakteristických skupin.

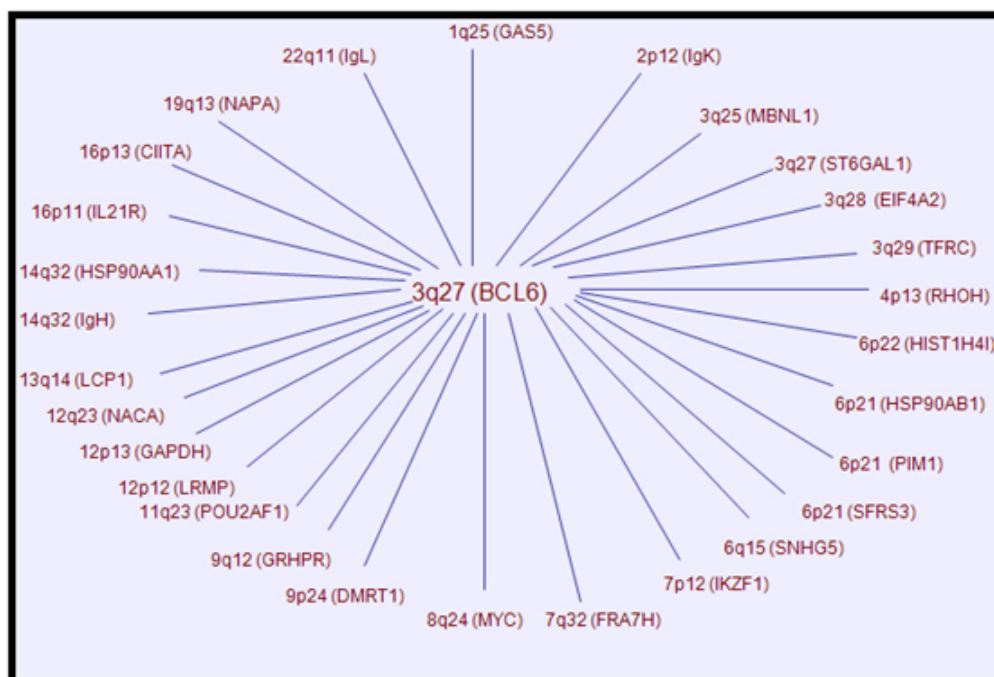
U každého z těchto onemocnění je šipkou znázorněn histogenetický původ a je doplněn informací o nejčastějším genetickém zásahu spojeným s daným onemocněním.

Přibližně 80-90% folikulárních lymfomů (FL) a zhruba 35% DLBCL je spojeno s translokací genu *bcl-2*. Nejčastěji jde o chromozomální translokace t(14;18)(q32;q21). Při této translokaci dochází k přesunu genu *bcl-2*, ležícího na lokusu q21 chromozomu 18, do oblasti lokusu q32 na chromozomu 14. Při translokaci dochází k připojení genu *bcl-2* od 3' nepřekládané oblasti k sekvenci genů pro těžké řetězce imunoglobulinů (Georgescu et al., 2010). Důsledkem této translokace je porucha regulace a nadměrná exprese genu *bcl-2*, neboť oblast genů pro těžké řetězce imunoglobulinů (IgH) vykazuje vysokou transkripční aktivitu. Gen *bcl-2* kóduje 26 kDa integrální membránový protein, který je lokalizován ve vnější mitochondriální membráně (Krajewski et al., 1993). Protein Bcl-2 patří do rodiny proteinů, které fungují jako regulátory apoptózy. Po translokaci dochází ke zvýšení exprese genu *bcl-2*, což vede k abnormálně dlouhému přežívání B-lymfocytů a hromadění dalších genetických chyb, které jsou nezbytné k nádorové transformaci.

Jednou z nejčastějších genetických alterací, která bývá nalezena až u 40% DLBCL a 5-15% FL, je translokace chromozomu 3q27, který obsahuje gen *bcl-6*. Asi v 50 % případů translokace 3q27 dochází k přesunu genu *bcl-6* do oblastí genů pro syntézu imunoglobulinových řetězců, nejčastěji do oblastí těžkých řetězců IgH (14q32), řetězců kappa (IgK) (2p12) nebo řetězců lamda (IgL) (22q12). Jsou však popsány i případy jiných translokací. V některých případech DLBCL dochází k translokaci genu pro IL-21 pod promotor genu *bcl-6*, zatímco kódující oblast genu *bcl-6* je přenesena do regulační oblasti genu pro IL-21 (Ueda et al., 2002). Výsledkem této translokace je zvýšená exprese obou proteinů. Variabilitu translokačních partnerů genu *bcl-6* dokresluje obrázek č. 3.

Protein Bcl-6 je transkripční faktor, který je esenciální pro správný vývoj B- a T-lymfocytů a pro normální funkci protilátkové imunitní odpovědi. Fyziologická funkce proteinu Bcl-6 byla objevena na „knock-out“ myších. Myši, které jsou deficientní v genu *bcl-6*, nevytvářejí germinální centrum (GC), a nejsou tedy schopné produkovat vysokoafinitní protilátky. GC je shlukem rychle proliferujících B-lymfocytů, které po setkání s T-nezávislým antigenem migrovali do primárního folikulu. Bylo také prokázáno, že protein Bcl-6 hraje zásadní roli při vývoji folikulárních pomocných T buněk ( $T_{FH}$ ). Tyto buňky patří do skupiny  $CD4^+$  T-lymfocytů a hrají roli při vytváření GC. Hlavní funkcí  $T_{FH}$  buněk je vytvářet vhodné prostředí v GC pro proliferující aktivované B-lymfocyty, které produkují vysokoafiní protilátky a ze kterých mohou

vzniknout plazmatické či paměťové buňky (Baron et al, 1993; Kerckaert et al, 1993; Ye et al, 1993).



**Obr. č. 3 Translokační partneři genu bcl-6. Převzato z Xu et al., 2000.**

Až 100% případů Burkittova lymfomu (BL) je spojeno s chromozomálními translokacemi genu c-Myc. Gen c-Myc kóduje transkripční faktor, který má duální úlohu v regulaci transkripce. Za určitých okolností funguje jako iniciátor exprese cílových genů, avšak je schopen fungovat také jako transkripční represor. Předpokládá se, že protein c-Myc je zodpovědný za regulaci zhruba 15% všech buněčných genů. Reguluje především geny řídící buněčný růst a kontrolu buněčného cyklu, geny buněčného metabolismu a geny účastněné v apoptóze (Klapproth, Wirth, 2010).

Gen c-Myc je lokalizován na chromozomu 8q24 a nejčastěji dochází při translokacích k jeho přesunu do oblasti genů, které kódují imunoglobulinové řetězce. Nejčastější je translokace t(8;14), při které dochází k začlenění genu c-Myc pod promotor genu pro IgH. Méně časté jsou t(2;8) do míst pro IgK a t(8;22) do míst pro IgL. Protein c-Myc je poté konstitutivně exprimován ve všech typech BL a chromozomální translokace genu c-Myc je jedním z diagnostických markerů tohoto onemocnění. Translokace genu c-Myc jsou však spojeny i s jinými NHL. Abnormality genu c-Myc jsou spojeny také s DLBCL, FL nebo např. MCL. FL je příkladem tzv.

„double-hit lymphoma“. Takový lymfom má nejen t(14;18), která je spojena s deregulací genu Bcl-2, ale také deregulaci genu c-Myc. Takovéto lymfomy se vyskytují zřídka, ale obvykle bývají agresivnější, rezistentní ke standardní terapii a bývají spojené s vyšší mortalitou (Ruzinova et al., 2010).

### **2.1.3. Lymfom z pláštěvých buněk**

MCL patří mezi agresivní B-lymfomy a reprezentuje 3-10% všech NHL. Medián věku první manifestace je 65-70let a postihuje častěji muže. Jedná se o lymfom s jednou z nejhorších prognóz a průměrné pětileté přežití pacientů se pohybuje pod 20%. MCL se léčí agresivní chemoterapií v kombinaci s monoklonální protilátkou anti-CD20 (Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. a kol., 2008). MCL je tvořen B-lymfocyty z vnitřního pláště lymfatických folikulů, které tvoří uniformní populaci buněk pre-germinálního typu. V 20-30% případů jsou detekovány somatické mutace ve variabilních oblastech genů pro IgH, což vede k hypotéze, že některé tyto nádory pocházejí z buněk GC. Buňky MCL vykazují nodulární, difuzní a pláštěvý růst, napodobující přirozený kompartment lymfatického folikulu. Větší buňky, které ztratily nodulární nebo pláštěvé uspořádání a mají vyšší mitotickou aktivitu, vytváří blastickou variantu MCL (Duggan et al., 1990). MCL je nejčastěji lokalizován v lymfatických uzlinách, dalšími zasaženými orgány bývají slezina a kostní dřeň, a to buď s infiltrací, nebo bez infiltrace periferní krve (Cohen et al., 1998).

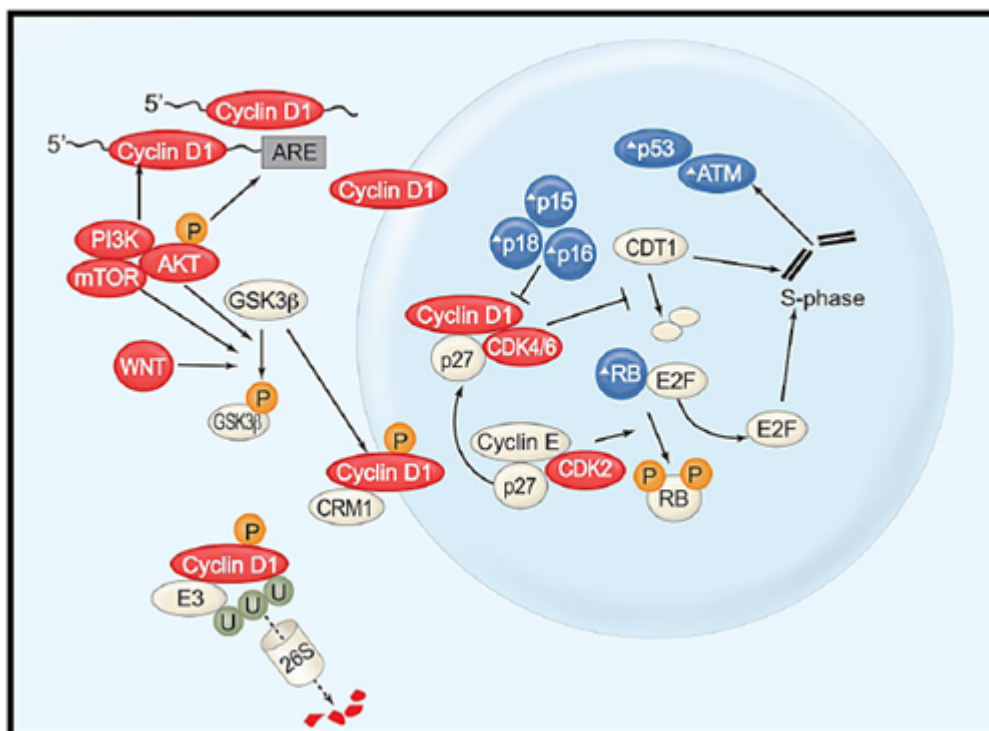
#### **2.1.3.1. Molekulární patologie MCL**

Patogeneze MCL je způsobena různými genetickými a molekulárními aberacemi. Hlavní znak, který charakterizuje MCL, je translokace t(11;14). Mezi další genetické zásahy, které zvyšují potenciál vzniku nádoru, patří inaktivace opravného systému DNA (DNA damage response). Tyto genetické události vedou k deregulaci buněčného cyklu, progresi nádoru a genetické nestabilitě. Navíc byly objeveny některé signální dráhy, které přispívají k patogenezi MCL. Většinou dochází ke konstitutivní aktivaci signálních drah jako PI3K, AKT a mTOR, které vedou k proliferaci a přežívání nádoru. Významné v progresi nádoru se také zdají být dráhy Wnt, Hedgehog a NF-κB. Právě tímto směrem se ubírá výzkum, který se snaží objasnit složitou roli signálních drah v onkogenezi nádorů.

### 2.1.3.2. Role t(11;14) a cyklinu D1 u MCL

Jak již bylo zmíněno pro MCL je charakteristická chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32). Při této translokaci dochází k přesunu genu CCND1, který kóduje protein cyklin D1, pod promotor genů pro IgH (Jares, Campo, 2008). Cyklin D1 reguluje přechod buněčného cyklu z G1 fáze do S fáze a za fyziologických podmínek není protein cyklin D1 v lymfocytech exprimován. Protein Cyklin D1 interaguje s cyklin-dependentními kinázami 4 a 6 (CDK4 a CDK6). Tyto interakce vedou k fosforylaci a inaktivaci proteinu Rb, který hraje klíčovou roli v inaktivaci transkripčního faktoru E2F. Tento transkripční faktor reguluje transkripci esenciálních genů nezbytných pro vstup buňky do S fáze a replikaci DNA (Harbour, Dean, 2000). Uvolnění a aktivace E2F vede zároveň ke tvorbě komplexu cyklin E/CDK2, který ireverzibilně inaktivuje pRb a buňka nevratně vstupuje do S fáze. Zároveň dochází ke stabilizaci komplexu cyklin D1/CDK4 vazbou inhibitoru p27Kip1. Interakce p27Kip1 inhibuje možnou aktivaci ostatních cyklin dependentních kináz a tím dochází k zastavení buněčného cyklu v S fázi (Quintanilla-Martinez et al., 2003). Role cyklinu D1 v patogenezi MCL je popsána na obrázku č. 4.

Translokace t(11;14) a deregulace cyklinu D1 má velký význam v diagnostice MCL. Diferenciální diagnóza je často obtížná bez použití imunohistochemických, cytogenetických a molekulárních vyšetření. Konvenční cytogenetická vyšetření jsou schopna prokázat charakteristickou translokaci u 65% případů MCL. Mnohem úspěšnější je detekce pomocí DNA „fiber“ FISH, která detekuje přítomnost translokace až v 95% případů (Vaandrager et al., 1996), avšak běžně se provádí spíše interfázní FISH. Téměř 100% případů MCL je detekováno pomocí měření hladiny mRNA cyklinu D1. Zároveň je tato metoda velmi užitečná při monitorování minimální reziduální nemoci u pacientů s MCL (Břízova et al., 2008). Translokace t(11;14) může být detekována také pomocí PCR. Většina zlomů na chromozomu 11 je sdružena do tzv. translokačních klastrů. Zhruba 30-50% případů MCL vykazuje přeskupení do oblasti hlavního translokačního klastru (MTC). Vyšetření přeskupení v oblasti MTC slouží jako molekulární diagnostický marker pro MCL, avšak diagnostika MCL pomocí PCR je limitována lokalizací zlomů (Jares, Campo, 2008).



**Obr. č. 4 Role cyklinu D1 v patogenezi MCL. Převzato z Pérez-Galán et al., 2011.**

Na obrázku jsou znázorněny některé mechanismy kontroly buněčného cyklu, které mohou být patologicky změněny u MCL. Modře jsou znázorněny proteiny, které bývají u MCL inaktivovány či mají sníženou expresi. Naopak červené jsou proteiny, u kterých dochází k nadprodukci či permanentní aktivaci (Pérez-Galán et al., 2011).

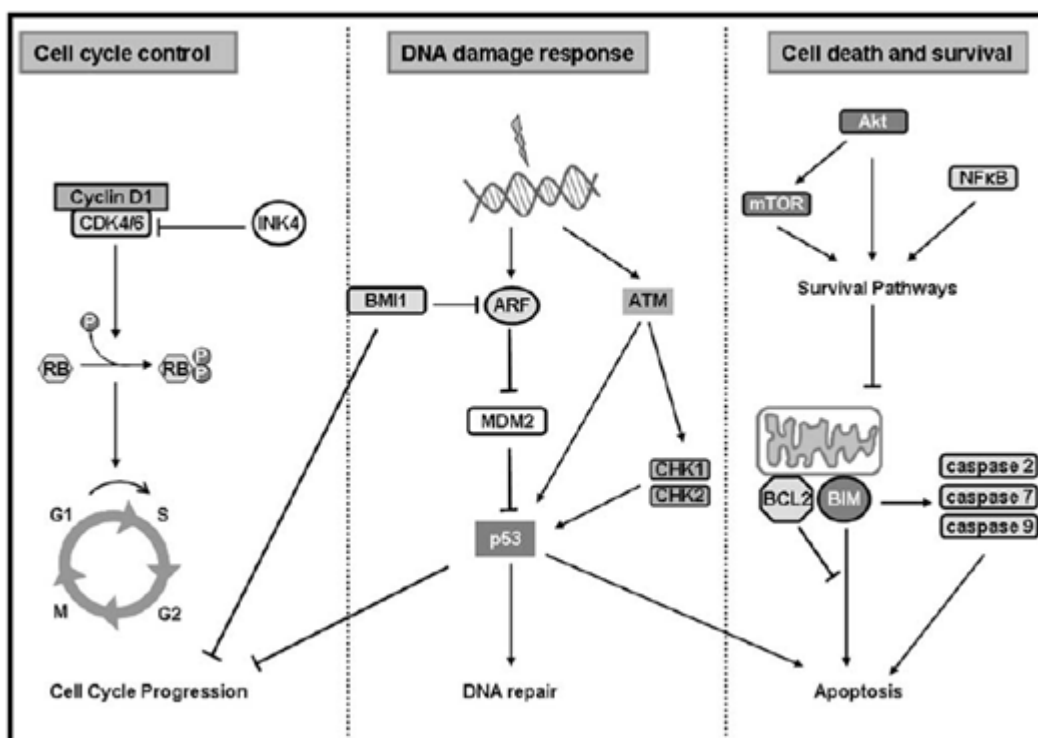
#### **2.1.3.3. Genetická nestabilita u MCL**

MCL patří mezi lymfomy s vysokou chromozomální nestabilitou a jsou pro něj typické sekundární genetické defekty. Byly popsány defekty v genech, které se účastní regulace buněčného cyklu, odpovědi na poškození DNA (DNA damage response), signálních drah a apoptózy. Původ genetické nestability je neznámý. Předpokládá se, že klíčová je nadměrná exprese cyklinu D1. Komplex cyklin D1/CDK4 je schopen inhibovat degradaci proteinu CDT1, který funguje jako iniciační faktor replikace. Stabilizace proteinu CDT1 v S fázi může vést k aberantní reiniciaci DNA replikace, tak jak je znázorněno na obrázku č. 4. Tento proces vede k tvorbě genových duplikací a různých genových variací. Navíc dochází k nárůstu počtu dvouvláknových zlomů na molekule DNA, což vede k dalším chromozomálním aberacím a k aktivaci „DNA damage response“ (Bea et al., 2009).

Nejčastější sekundární alterace u MCL můžeme rozdělit do několika odlišných skupin. Do první kategorie můžeme řadit proteiny, které spadají do regulace buněčného cyklu. Již zmíněná translokace t(11;14), při které dochází k nadměrné expresi cyklinu D1, může být doprovázena delecí lokusu CDKN2A na chromozomu 9p21. Tento lokus kóduje dva odlišné tumor supresorové geny. Prvním z nich je gen INK4a. Tento gen kóduje tumor supresorové proteiny p14 a p16. Tyto proteiny jsou specifické inhibitory CDK4 a CDK6. Svojí vazbou na komplexy cyklin/CDK zastavují fosforylaci cílových molekul a tím inhibují progresi buněčného cyklu. Tato alterace bývá většinou asociována s agresivnější blastickou formou MCL (Pinyol et al., 1997). Druhým tumor supresorovým genem je gen ARF, který je alternativní sestřihovou formou INK4a. Tento gen kóduje protein, který inaktivuje degradaci proteinu p53. Protein ARF tedy inaktivuje protein MDM2, který je odpovědný za degradaci proteinu p53. Při ztrátě funkce proteinu ARF dochází ke zvýšené degradaci p53 a následné deregulaci buněčného cyklu a apoptózy.

Do další kategorie patří geny, které jsou zapojeny do dráhy reagující na poškození DNA. Do této kategorie patří také výše zmíněný gen ARF, který ovlivňuje působení tumor supresorového proteinu p53. Zásadní roli v buněčné odpovědi na DNA poškození má gen ataxia telangiectasia mutated (ATM). Gen ATM kóduje protein kinázu příbuznou rodině PI3K. Tato kináza je běžně exprimována v naivních B-lymfocytech a účastní se rekombinace imunoglobulinových genů (Greiner et al., 2006). Přibližně v 25-50% případů MCL dochází k delecí 11q22-23 či bodové mutaci způsobující defekt v genu ATM. Předpokládá se, že inaktivace genu ATM vede k chromozomální nestabilitě. Neschopnost reparace dvouvláknových zlomů na DNA se projevuje defektní V(D)J rekombinací, která je jedním z možných mechanismů vzniku t(11;14) (Camacho et al., 2002). Byly prokázány také případy MCL, kde jsou mutovány ostatní zástupci „DNA damage response“. Pro mutaci tumor supresorového genu p53 je charakteristická delece 17p13, která je typická pro blastoidní formu MCL (Jares, Colomer, Campo, 2007). Byly prokázány také mutace v genech Ch1, Ch2 či MDM2, které jsou úzce spjaty s regulací proteinu p53 a celkově se signalizací reagující na poškození buněčné DNA. Schéma znázorňující vztahy mezi proteiny dráhy „DNA damage response“ je znázorněno na obrázku č. 5.





**Obr. č. 5 Molekulární dráhy zahrnuté v patogenezi MCL. Převzato z Obrador-Hevia et al., 2009.**

Na obrázku jsou shrnuty vztahy mezi proteiny buněčných mechanismů, které jsou deregulovány u MCL. Dochází k deregulaci proteinů kontroly buněčného cyklu, dráhy „DNA damage response“ a také dráhy iniciující apoptózu.

Do poslední kategorie molekul, které jsou spjaty s patogenezí MCL, patří geny, které jsou zapojeny do signálních drah buněčného růstu a diferenciace, apoptózy a signalizace přežití. Nedávné studie poukazují na fakt, že alterace v těchto mechanismech přispívají k nádorové proliferaci, redukci imunitního dozoru a usnadňují obcházení apoptózy. Patří sem především signalizace přes receptory B-lymfocytů (BCR), signalizační kaskáda PI3K/AKT/mTOR, signalizační dráhy Wnt a Hedgehog a již zmíněná NF-κB. Právě tyto dráhy jsou cílem výzkumu nových terapeutických postupů, které by vedly ke zlepšení léčby a prognózy u pacientů s MCL (Obrador-Hevia et al., 2009).

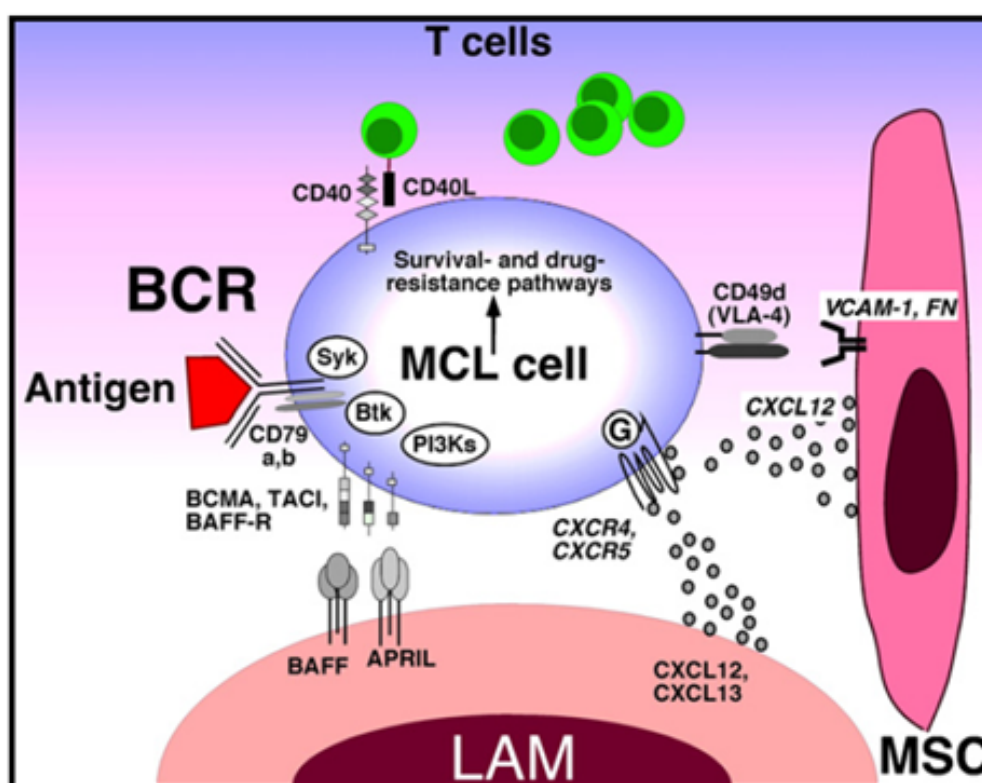
#### 2.1.3.4. Význam mikroprostředí a jeho interakcí s MCL

Stále přibývá důkazu o významu interakcí tkáňového mikroprostředí s buňkami MCL. Interakce mezi nádorovými buňkami a stromálními buňkami mikroprostředí, které může tvořit kostní dřev či sekundární lymfoidní orgány, má vliv na progresi nádoru. Předpokládá se, že tyto interakce vedou k vývoji lékové rezistence a především k podpoře růstu a přežívání nádorových buněk (Burger, Ford, 2011). Konvenční léčba eliminuje většinu buněk MCL, avšak reziduální nádorové buňky mohou zůstat skryté před touto léčbou, neboť právě interakce s mikroprostředím jim poskytuje dostatečnou ochranu. Takovéto reziduální nádorové buňky pak umožňují vznik minimální reziduální nemoci a popřípadě i následný relaps onemocnění.

Růst, diferenciaci, přežívání a diseminace nádorových B buněk je řízena a kontrolována velkým počtem exogenních faktorů, vyžadujících kontakt B buněk a pomocných buněk jako jsou dřevové stromální buňky, antigen prezentující buňky (APC) a T-lymfocyty. Klíčovou roli v komunikaci mezi nádorovými buňkami a mikroprostředím hrají signální receptory jako BCR či TLR (Toll-like receptory), různé cytokinové a chemokinové receptory a také adhezivní molekuly. Poslední studie předpokládají, že právě tyto molekuly a dráhy jsou aktivní v maligních B buňkách a přispívají k progresi a lékové rezistenci lymfomů (Dal Colet al., 2008; Kurtova et al., 2009; Pighi et al., 2011). MCL vykazuje vysoký sklon k šíření a osidlování v odlišných tkáních než kde vznikl primární nádor. Šíření a osidlování jiných tkání lymfomovými buňkami je komplexní a přísně regulovaný proces, který vyžaduje nejen expresi mnoha adhezivních molekul a receptorů, ale také vytvoření chemokinového gradientu, který je tkáňově specifický a atrahuje nádorové buňky do příslušných míst. Osídlení tkáňového mikroprostředí buňkami MCL umožňuje vytvoření interakcí s mezenchymálními stromálními buňkami (MSC) a lymfom podporujícími makrofágy (LAM) (Burger, Ford, 2011).

Cílem posledních studií je co možná nejlépe specifikovat mikroprostředí, které obklopuje a interaguje s nádorovými buňkami. Bylo zjištěno, že jedním typem buněk, které jsou schopny interagovat s buňkami MCL, jsou T-lymfocyty. U NHL bylo prokázáno, že dochází k infiltraci nádoru vysokým počtem  $CD4^+CD25^+$  T-lymfocytů, které exprimují proteiny CTLA-4 a FoxP3. Jedná se o regulační lymfocyty (Treg), které v případě nádoru jsou schopny potlačovat protinádorovou aktivitu  $CD4^+$  T-lymfocytů,

což následně vede k progresi nádoru (Yang et al., 2006; Burger, Ford, 2011). Další buněčnou populací, která se podílí na ustanovení rovnováhy mezi nádorem a tkáňovým mikroprostředím, jsou makrofágy, které jsou označovány zkratkou LAM. Dalším buněčným typem, který má význam pro vztah mikroprostředí k MCL, jsou MSC, především jejich subtyp stromální buňky kostní dřeně (BMSC). Předpokládá se, že interakce BMSC s buňkami MCL, přispívá k vytvoření rezistence vůči chemoterapeutikům (Kurtova et al., 2009). Interakce mezi MCL a tkáňovým mikroprostředím je shrnuto na obrázku č. 6.



**Obr. č. 6 Buněčné a molekulární interakce mezi MCL a tkáňovým mikroprostředím. Upraveno dle Burger, Ford, 2011.**

Na tomto obrázku jsou znázorněny molekuly a interakce, které vytváří tkáňové mikroprostředí vůči buňkám MCL. Kontakt mezi LAM a MSC je ustanoven především pomocí adhezivních molekul a chemokininových receptorů. LAM a MSC atrahují buňky MCL pomocí G proteinu spáženého s chemokininovými receptory (CXCR4, CXCR5), které jsou silně exprimovány na povrchu buněk MCL (Kurtova et al., 2009). Integriny VLA-4 kooperují s chemokininovými receptory v adhezi MSC k buňkám MCL pomocí vazby na stromální ligandy (VCAM, fibronectin/FN). LAM navíc exprimují receptorové molekuly BAFF a APRIL, které zřejmě poskytují signály přežití pro buňky MCL, které nesou na svém povrchu jejich ligandy (BCMA, TACI, BAFF-R) (Rodig et al., 2005). Antigenní stimulace přes BCR komplex spouští signalizační dráhy, které též přispívají k patogenezi MCL.

Svoji úlohu v patogenezi a progresi lymfomů zřejmě hraje také antigenní stimulace. Při antigenní stimulaci přes BCR komplex dochází k aktivaci signálních drah, které vedou ke klonální expanzi B-lymfocytů, což přispívá k progresi lymfomu (Pérez-Galán et al., 2011). Zároveň bylo prokázáno, že proteinkinázy Syk a Btk, které jsou asociovány s BCR komplexem, jsou silně exprimovány v buňkách MCL, což potvrzuje možnost, že BCR signalizace má jistou roli v progresi lymfomů (Pighi et al., 2011). S novými poznatky dochází také k vývoji nových terapeutických látek. Jedním mechanismem účinku těchto látek je rozrušení interakcí mezi mikroprostředím a buňkami MCL. Druhý způsob účinku je blokace signalizace, která je asociovaná s BCR komplexy. Tyto látky snad přinesou prvotní výsledky, které by mohly být následně využity v terapii MCL a jiných B-buněčných lymfoproliferativních onemocněních.

## 2.2. Genová variabilita imunoglobulinů při vývoji B-lymfocytů

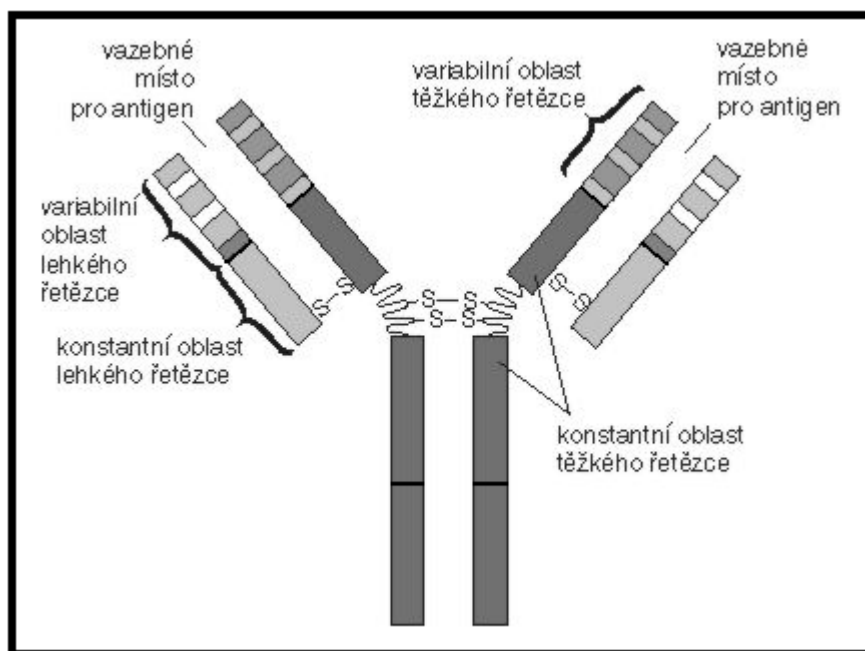
V lidském organismu je připraveno velké množství B-lymfocytů, které se liší strukturou vazebných míst na svých povrchových receptorech. Povrchové receptory B-lymfocytů jsou imunoglobuliny, které jsou integrovány do plazmatické membrány a jsou asociovány se signálními molekulami, které přenášejí signál po stimulaci receptoru antigenem. Hlavním důvodem, proč existuje genová variabilita imunoglobulinů, je obrovský repertoár antigenů, na které musí imunitní systém, v tomto případě B-lymfocyty, popřípadě protilátky reagovat. Proteinové řetězce, které vytvářejí strukturu imunoglobulinů, jsou kódovány velkým počtem genových segmentů a při vývoji lymfocytů dochází k zásadním změnám ve struktuře genových segmentů. Právě změny genových segmentů a další mechanismy, které budou probrány později, přispívají k velké variabilitě receptorových míst imunoglobulinů. Takto je v lidském organismu zajištěno, aby imunitní systém mohl reagovat na velké množství antigenů, aniž by musel pro každý antigen kódovat příslušný receptor.

### 2.2.1. Imunoglobuliny a receptory B-lymfocytů

Základní strukturu rozpustných imunoglobulinů tvoří dva těžké (H) řetězce, které jsou kovalentně spojeny disulfidickými můstky. Toto místo spojení se nazývá pantová (hinge) oblast. Ke každému H-řetězci je připojen jeden lehký (L) řetězec pomocí cystinového můstku. H-řetězce se skládají ze čtyř či pěti strukturně podobných domén. Počet domén je závislý na třídě imunoglobulinu. Také L-řetězce se skládají z domén, které jsou v tomto případě vždy dvě. Domény na N-konci H i L-řetězce jsou variabilní (označují se  $V_H$  a  $V_L$ ). Variabilní domény L- a H-řetězců společně vytvářejí vazebné místo pro antigen. Ostatní domény jsou konstantní, neboť jsou shodné u řetězců stejného typu imunoglobulinu. Struktura molekuly imunoglobulinu je znázorněna na obrázku č. 7.

Existují dva typy L-řetězců,  $\kappa$  a  $\lambda$ , které se liší primární strukturou konstantních domén a které jsou kódovány odlišnými geny. Velikost a všeobecné funkční vlastnosti jsou si velmi podobné. Naopak konstantní části H-řetězců jsou uspořádány tandemově na úseku jediného chromozomu. Existuje pět typů H-řetězců,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ . U člověka existují čtyři subtypy řetězce  $\gamma$ ,  $\gamma_1$ - $\gamma_4$  a dva subtypy řetězce  $\alpha$ ,  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ . Imunoglobuliny tvořené příslušnými řetězci se vyskytují v izotopech IgM, IgD, IgG1-IgG4, IgA1 a IgA2

a IgE. Kterýkoliv typ H-řetězce se může párovat s L-řetězcí typu  $\kappa$  a  $\lambda$  a vytvářet tak kompletní molekulu imunoglobulinu (Rajewsky, 1996).



**Obr. č. 7 Struktura molekuly imunoglobulinu.<sup>1</sup>**

Na obrázku je znázorněna obecná struktura povrchového imunoglobulinu, který se skládá ze dvou H-řetězců a dvou L-řetězců spojených disulfidickými můstky. Jsou zde označeny jak konstantní domény, tak i variabilní domény, které vytvářejí vazebné místo pro antigen.

Antigenně specifické receptory jednotlivých B-lymfocytů jsou povrchové imunoglobuliny. Komplex BCR se tedy skládá z vlastního povrchového imunoglobulinu a asociovaných signalizačních molekul. H-řetězce jsou transmembránové proteiny a v C-terminální části mají úsek 20 hydrofóbních aminokyselin, kterými jsou zanořeny do plazmatické membrány. Povrchové imunoglobuliny patří nejčastěji k třídám IgM a IgD. S povrchovým imunoglobulinem jsou asociovány dva transmembránové proteiny zvané  $Ig\alpha$  (CD79 $\alpha$ ) a  $Ig\beta$  (CD79 $\beta$ ), které dohromady s ním vytvářejí komplex BCR.  $Ig\alpha$  a  $Ig\beta$  mohou být nekovalentně asociovány s cytoplazmatickými protein tyrozin-kinázami skupiny Src. Po navázání antigenu se spouští signální kaskáda, která může vést ke změně transkripce, buněčnému dělení či diferenciaci B-lymfocytu na plazmatickou buňku produkující velké množství protilátek (Borst et al., 1993).

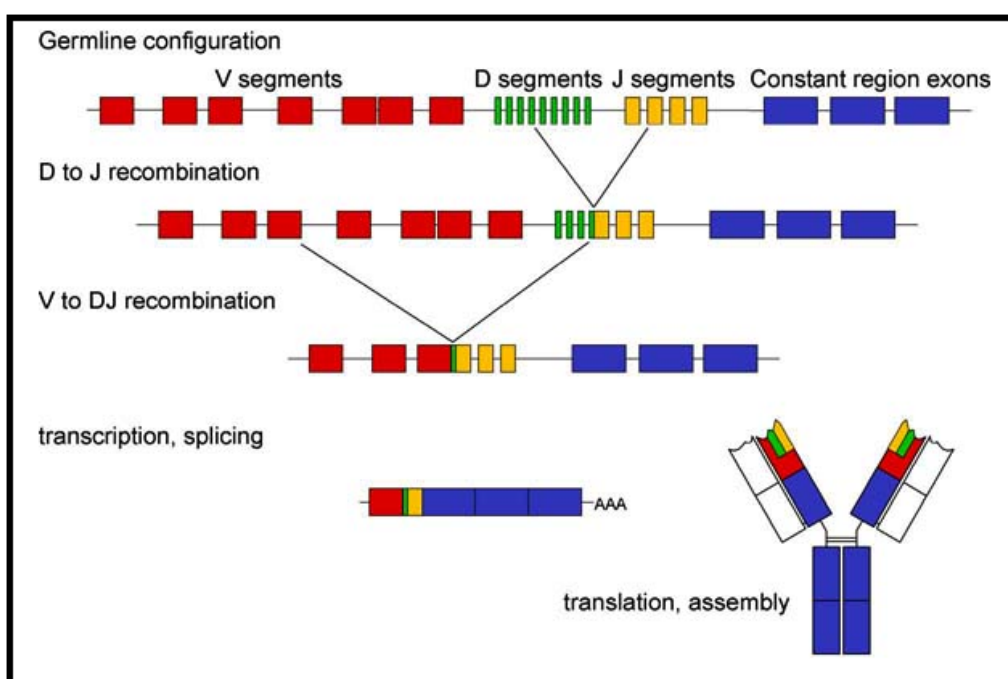
<sup>1</sup> Dostupné z [http://www.vesmir.cz/files/obr/nazev/2000\\_446\\_01.jpg/type/html](http://www.vesmir.cz/files/obr/nazev/2000_446_01.jpg/type/html). [online]. [cit. 2012-01-18].

### 2.2.2. Přestavby imunoglobulinových genů B-lymfocytů

Geny, které kódují H-řetězce imunoglobulinů, jsou lokalizovány na chromozomu 14q32 (Croce et al., 1979). L-řetězce  $\kappa$  a  $\lambda$  jsou kódovány geny na chromozomech 2p12, respektive 22q11 (McBride et al., 1982). Geny kódující řetězce imunoglobulinů se skládají z velkého počtu různých úseků. Genové segmenty, jak jsou tyto úseky označovány, podléhají při vývoji B-lymfocytů přeskupování, které umožňuje vznik vysoce variabilních vazebných míst pro antigen na molekule imunoglobulinu. Tímto procesem je umožněno, aby imunitní systém reagoval na obrovské množství různých antigenů.

#### 2.2.2.1. Uspořádání genů kódující imunoglobuliny

Komplex genových segmentů IgH obsahuje na 5' konci skupinu několika set sekvenčně podobných úseků V (variable), dále následuje skupina asi 27 krátkých segmentů D (diversity), a pak skupina 9 krátkých segmentů J (joining). Na 3' konci komplexu jsou tandemově uspořádány geny kódující konstantní části H-řetězců imunoglobulinů. Tyto konstantní části bývají označovány jako C (constant) segmenty. Úseky V, D, J kódují variabilní (N-terminální) domény H-řetězců, zatímco C segmenty kódují celou konstantní část imunoglobulinového řetězce. Na obrázku č. 8 je znázorněno schematické uspořádání genových segmentů kódující IgH.

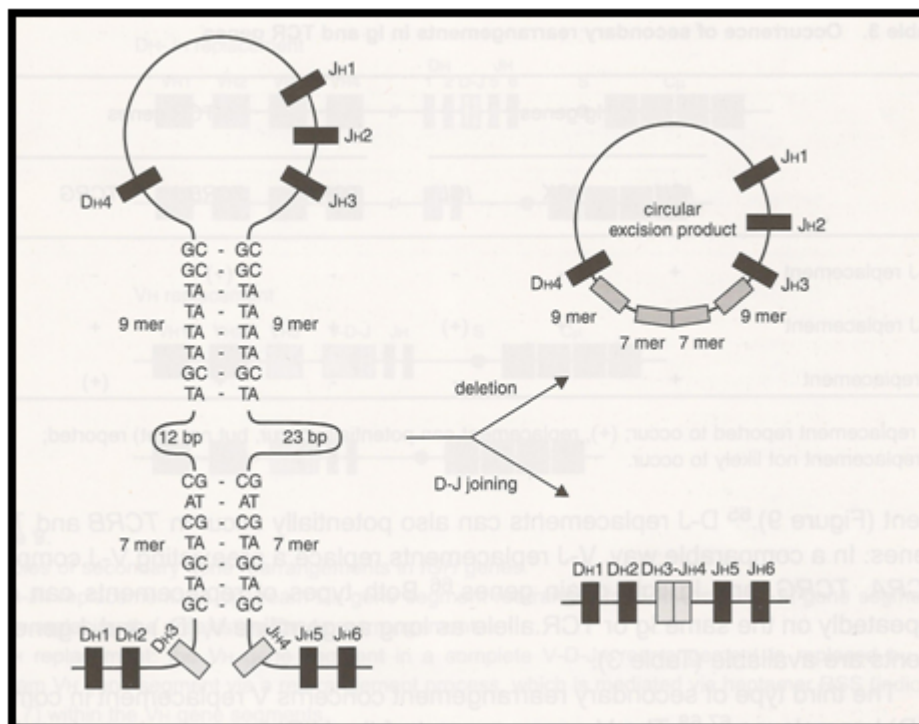


Obr. č. 8 Uspořádání genových segmentů kódující IgH a proces V(D)J rekombinace. Převzato z Janeway, 2001.

Struktura genových komplexů kódujících L-řetězce  $\kappa$  a  $\lambda$  je podobná, ale jednodušší, protože neobsahují D segmenty a skládají se z menšího počtu úseků V a J. Co se týče konstantních segmentů, tak u řetězce  $\kappa$  existuje pouze jeden. Řetězec  $\lambda$  je kódován několika C-segmenty. Proces přeskupování imunoglobulinových segmentů je označován jako V(D)J rekombinace (van Dongen, Wolvers-Tettero, 1991).

#### 2.2.2.2. Mechanismus V(D)J rekombinace

V(D)J rekombinace je sled několika po sobě jdoucích molekulárních dějů, které vedou ke vzniku specifických povrchových a rozpustných imunoglobulinů při vývoji B-lymfocytů. Proces V(D)J rekombinace je zprostředkován rekombinázovými komplexy. Klíčovou roli v procesu rozpoznání a rozstřížení DNA hrají proteiny RAG1 a RAG2, které rozpoznávají rekombinační signální sekvence (RSS), které jsou umístěny za V segmenty, z obou stran D segmentů a před J segmenty (Fungmann et al., 2000; Gellert, 2002). RSS jsou evolučně konzervované a vykazují heptamerové a nonamerové palindromické uspořádání. Heptamerové sekvence jsou od nonamerových sekvencí odděleny oblastí 12 a 23 párů nukleotidů. V první fázi rekombinace dochází v oblasti RSS k vytvoření vlásenky a pomocí RAG enzymů je DNA specificky štěpena. Při štěpení dochází ke vzniku cirkulární excizní DNA, tak jak je znázorněno na obrázku č. 9.

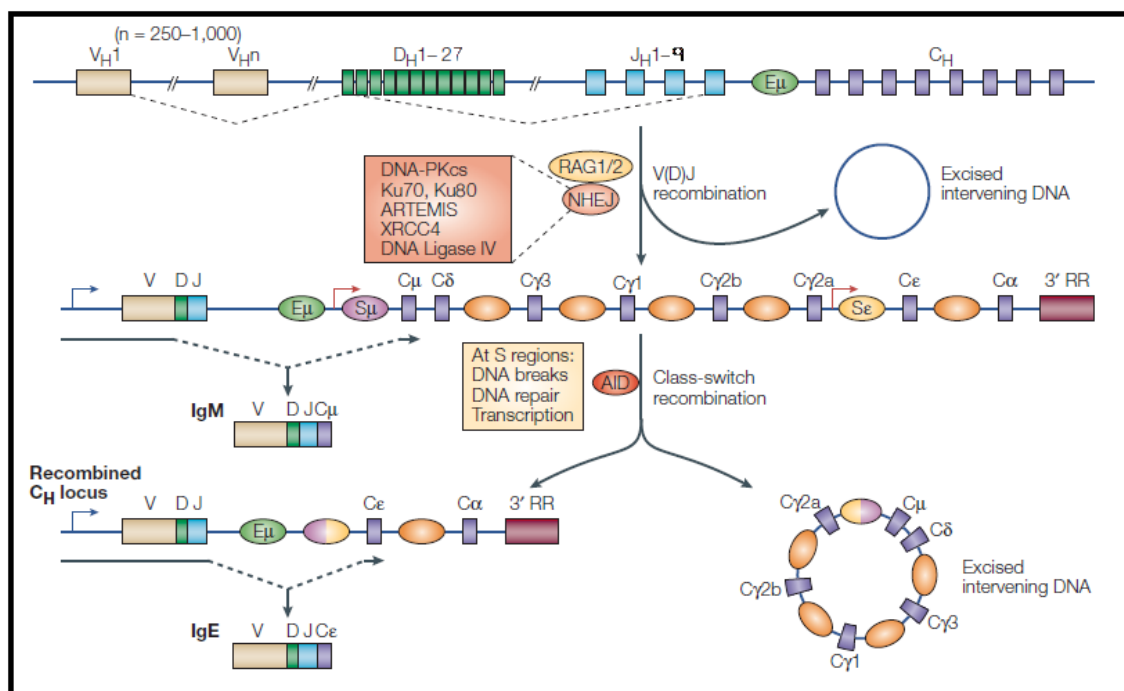


Obr. č. 9 Struktura RSS a mechanismus rekombinace. Převzato z Lieber, 1992.



Spojení konců DNA po rekombinaci zajišťuje komplex proteinů „non-homologous end-joining“ (NHEJ), jež patří mezi proteinové komplexy, které zajišťují integritu DNA. Do tohoto komplexu patří proteiny jako Ku70, Ku80, ARTEMIS, X-ray repair cross-complementing protein 4 (XRCC4), DNA ligase IV a katalytická podjednotka DNA-dependentní protein kinázy (DNA-PKcs), které jsou zobrazeny na obrázku č. 10. Také C segmenty mají specifické signální sekvence, které jsou označovány jako přesmykové („switch“) a jsou rozeznávány enzymy, jež provádějí izotopový přesmyk, který je velmi důležitý pro vznik různých imunoglobulinových tříd (Helmink, Sleckman, 2012). Jeho mechanismus bude probrán dále v textu.

V prvním kroku V(D)J rekombinace dochází v pro-B-lymfocytech k přeskupování genů pro IgH. Nejprve dochází k D-J přeskupení a jak název naznačuje, dochází ke štěpení a rekombinaci mezi náhodnými segmenty D a J. Tento proces může probíhat i opakovaně, dokud není vybrán jeden z 27 možných D segmentů a jeden z 9 možných J segmentů, které spolu fúzují. Tento děj probíhá paralelně na obou chromozomech. Po úspěšném D-J přeskupení dochází ke štěpení a rekombinaci mezi některým V segmentem a D-J segmentem, vzniklým v předchozím kroku. Toto přeskupování genových segmentů je označováno jako V-D přeskupení. Pokud je přeskupení produktivní a z odpovídající mRNA může vzniknout kompletní H-polypeptid, tak je přeskupování na druhém chromozomu zastaveno. Tento mechanismus je označován jako alelická exkluze. Pokud na prvním chromozomu nedojde k úspěšnému přeskupení, pokračuje přeskupování na druhém, pokud ani to není úspěšné, tak dochází k apoptóze dané buňky. Po přepisu přeskupeného IgH genu do mRNA dochází k sestřihu primárního transkriptu. Z obrázku č. 10 je patrné, že nejprve dochází k tvorbě těžkých řetězců  $\mu$ , protože  $C\mu$  leží nejbližší k VDJ segmentu. Po úspěšném přeskupení a tvorbě IgH se z buňky stává pre-B-lymfocyt, který syntetizuje k těžkému  $\mu$  řetězci náhradní L-řetězc, protože zatím nedošlo k jeho přeskupení (Hewitt, Chaumeil, Skok, 2010).



**Obr. č. 10 Přeskupování genů kódujících těžké řetězce imunoglobulinu.**  
Upraveno dle Chaudhuri, Alt, 2004.

Na obrázku jsou znázorněny molekulární mechanismy, které předcházejí vzniku imunoglobulinů. V první fázi dochází k V(D)J rekombinaci, které se účastní řada proteinových komplexů. Po úspěšné V(D)J rekombinaci vzniká IgM. Během diferenciací B-lymfocytů dochází k izotypovému přesmyku, při kterém se vyštěpují různé C-segmenty, a to umožňuje vznik ostatních tříd imunoglobulinů.

U L-řetězců probíhá vyštěpování stejně jako u H-řetězců, pouze s rozdílem, že L-řetězce neobsahují D segmenty. Nejprve dochází k V-J rekombinaci genů kódujících  $\kappa$  řetězce. I zde se objevuje efekt alelické exkluze. Pokud je rekombinace na prvním chromozomu neúspěšná, tak pokračuje z chromozomu druhého. Pokud však ani poté nevzniká správný  $\kappa$  řetězec, který by se mohl párovat s  $\mu$  řetězcem v molekule IgM, tak dojde k vyštěpování genů kódujících  $\lambda$  řetězce. Pokud ani poté nevzniknout správné L-řetězce, lymfocyt opět hyne apoptózou. Expresí povrchového IgM, který již obsahuje těžké  $\mu$  řetězce a k nim adekvátní  $\kappa$  či  $\lambda$  řetězce, se buňka stává nezralým B-lymfocylem (Hewitt, Chaumeil, Skok, 2010).

Individuální variabilita molekul imunoglobulinů je zajištěna především různými kombinacemi V(D)J genových segmentů. Existují však ještě další mechanismy, které tuto variabilitu zvyšují. Jedním z nich je tzv. spojovací variabilita. Po vyštěpení genových úseků během V(D)J rekombinace nejsou zbývající konce odstřiženy zcela přesně definovaným způsobem a jejich spojením mohou vznikat nové varianty. Navíc

po odštížení dochází k prodlužování konců o krátké náhodné úseky označované jako N-sekvence. Tyto náhodné úseky jsou přidávány působením enzymu terminální deoxynukleotidyl-transferázy (TdT), a protože jde opět o nahodilý proces bez nějakého vnitřního smyslu, dochází k zvyšování variability vazebných míst imunoglobulinů (Desiderio et al., 1984).

Genovou variabilitu vazebných míst imunoglobulinů zvyšují také somatické mutace, které jsou iniciovány po styku zralého B-lymfocyty s antigenem. Při těchto dějích dochází k intenzivním mutacím ve V segmentech již přeskupených genů, což vede k dalšímu vzrůstu počtu variant. Během tohoto mutačního procesu jsou selektovány klony B-lymfocytů, které vykazují vysokou afinitu k antigenu. Tento proces je označován jako afinitní maturace a vede ke vzniku vysokoafinních protilátek. Kromě změn afinity způsobených mutačními a selekčními procesy dochází také k izotypovému přesmyku, který je znázorněn na obrázku č. 10. Při izotypovém přesmyku dochází k vyštěpování C-segmentů imunoglobulinových řetězců, což ve výsledku vede k produkci imunoglobulinů jiné třídy (Chaudhuri, Alt, 2004).

### **2.2.3. Diferenciace B-lymfocytů**

K vývoji B-lymfocytů dochází z hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni. Mezi první identifikované prekurzory B buněk patří progenitor B-lymfocyty (pro-B-lymfocyt). Pro tuto buňku je charakteristická exprese některých lymfocytárních antigenů a iniciace přestaveb genů pro IgH. V okamžiku, kdy buňka úspěšně dokončí přeskupování IgH genů a prokáže to expresí  $\mu$  řetězců, se z ní stává pre-B-lymfocyt. Pre-B-lymfocyt tedy již syntetizuje  $\mu$  řetězec, avšak ten se nemůže asociovat s L-řetězcem, protože zatím nedošlo k jejich přeskupení. Pre-B-Lymfocyt proto syntetizuje náhradní L-řetězec ( $\psi$ L), který se skládá ze dvou malých proteinů VpreB a  $\lambda$ 5. Tento alternativní pre-B-receptor se objevuje na povrchu pre-B-lymfocyty a přispívá k diferenciaci a aktivaci přeskupení genů pro L-řetězce (Espeli et al., 2009). Po úspěšném přeskupení L-řetězců je na povrchu syntetizován IgM receptor, který je složen ze dvou  $\mu$  řetězců a dvou L-řetězců. Expresí povrchového IgM se buňka stává nezralým B-lymfocytem. Tímto je iniciální fáze vývoje B-lymfocytů, která probíhá v kostní dřeni prozatímne ukončena (Hewitt, Chaumeil, Skok, 2010).

Dalším krokem ve vývoji B-lymfocytů je, že nezralé B-lymfocyty opouští kostní dřeň a krevním řečištěm se dostávají do sekundárních lymfoidních orgánů. Tyto buňky

migrují v lymfatické tkáni a zakládají primární lymfoidní folikuly na styku s folikulárními dendritickými buňkami (FDC). Tento vývojový krok je spojen s expresí IgD. Tyto buňky vykazují fenotyp IgM+/IgD+ a jsou označovány jako naivní zralé B-lymfocyty. Pokud dojde ke styku naivních B-lymfocytů s antigenem na povrchu FDC, tak dochází během primární aktivace B-lymfocytů k iniciaci procesu somatických mutací (Harris et al., 2001). Zároveň dochází k migraci těchto buněk do extrafolikulárního prostoru, kde dochází k jejich proliferaci a konečné diferenciaci v krátkodobé plazmatické buňky (Benson et al., 2007). Antigenem aktivované naivní B-lymfocyty proliferují a diferenciují v centroblasty, které formují v primárním folikulu GC. Centroblasty následně diferenciují v centrocyty, které se polarizují na opačnou stranu GC než centroblasty. Toto uspořádání vytváří v GC dvě zóny. Tmavá zóna obsahuje centroblasty, centrocyty jsou obsaženy především ve světlé zóně. Naivní B-lymfocyty, které nejsou aktivované antigenem, migrují na okraj primárního folikulu, kde vytvářejí plášťovou zónu. Lymfatický folikul, který obsahuje jak GC, tak i plášť, se označuje jako sekundární lymfatický folikul. Během proliferace a diferenciacie centroblastů na centrocyty dochází k somatickým mutacím genů variabilních oblastí imunoglobulinových řetězců. Centrocyty, u kterých dojde ke změně vazebných míst a zvýšení afinity vůči antigenu, opouštějí GC a stávají se z nich dlouho žijící plazmatické buňky nebo paměťové buňky (Harris et al., 2001).

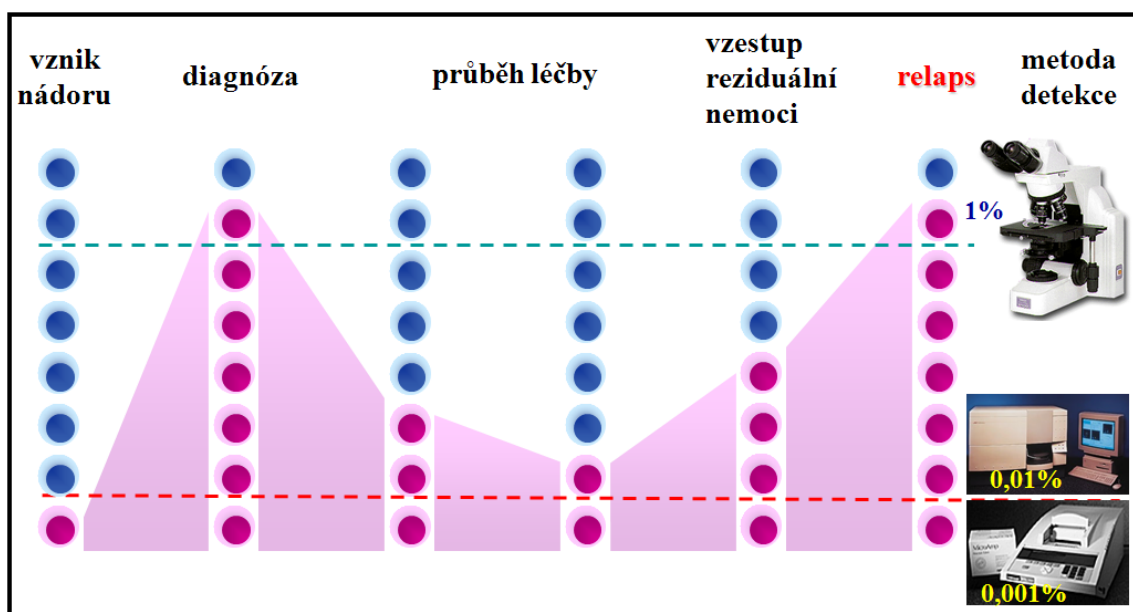
### 2.3. Minimální reziduální nemoc

Minimální reziduální nemoc (MRN) je definována jako subklinická úroveň nemoci, kdy v průběhu terapie již maligní buňky nejsou běžnými cytologickými metodami detekovatelné, viz obrázek č. 11. V této situaci se pacient nachází v kompletní klinické remisi, přesto se však v jeho těle může vyskytovat až  $10^{10}$  maligních elementů (Campana, Pui, 1995). Právě tyto zbytkové buňky, které unikly léčbě, mohou způsobit relaps onemocnění. Sledování MRN poskytuje významný prognostický faktor v léčbě některých maligních hematologických onemocnění jako akutní lymfoblastická leukémie (ALL), akutní myeloidní leukémie (AML), chronická myeloidní leukémie (CML), NHL a mnohočetný myelom (MM).

Moderní léčebné protokoly usilují o dosažení kompletní remise u pacientů s těmito onemocněními, nicméně často dochází k relapsu onemocnění u takto léčených pacientů. Sledování MRN je významné pro přesnější stratifikaci pacientů při začlenění do léčebných protokolů. Rozdělení pacientů je zaměřeno především na účinnější terapii u pacientů s vysokým rizikem relapsu a redukci léčby u pacientů s nízkým rizikem relapsu, kterým by mohly následně hrozit sekundární malignity, vyvolané terapií. Stratifikace pacientů pomocí klasických klinických a morfologických kritérií jsou již nepostačující. K detekci hematopoetických nádorových onemocnění podle klasických morfologických technik je nutné, aby maligní buňky tvořili 1-5% celkového počtu buněk v těle. Navíc morfologická kritéria poskytují pouze omezené informace o dynamice onemocnění či účinnosti léčebných postupů.

Hlavním přínosem sledování MRN u leukémií a lymfomů je, že poskytuje informace o dynamice onemocnění. Prvotní studie, které se věnovaly MRN a byly zaměřeny na pacienty s akutními leukémiemi, odstartovaly výzkum MRN (Gutterman et al., 1974). Původně byly využívány ke sledování MRN kvalitativní a semikvantitativní metody, které však poskytovaly pouze informace o přítomnosti či nepřítomnosti MRN (Goulden et al., 1998). Rozvoj kvantitativních metod, především „real-time quantitative PCR“ (RQ-PCR) a „real-time quantitative reverse transcription PCR“ (RQ-RT-PCR), umožnil, aby sledování MRN poskytovalo informace o dynamice onemocnění a případné odpovědi na léčbu u leukémií a lymfomů (Jaeger et al., 2003; van der Velden et al., 2003). Sledování hladiny MRN je klinicky velice významné a ze získaných

výsledků lze u pacientů s ALL předpovědět možný relaps onemocnění a včas zahájit léčebnou reakci (Brüggemann et al., 2012).



**Obr. č. 11 Schéma minimální reziduální nemoci a metody detekce s uvedením citlivosti - cytogenetika, průtoková cytometrie a metody molekulární genetiky.**

### 2.3.1. Kvantitativní metody sledování MRN

Principem sledování MRN je najít na nádorové buňce takový znak, který ponese celý nádorový klon a bude se jím lišit od buněk zdravých. Tímto znakem může být například translokace, změněná genová exprese, klonální přestavba. S využitím molekulární analýzy tohoto nádorově specifického znaku lze sledovat onemocnění na molekulární úrovni. V současné době existují u hematologických malignit tři základní způsoby detekce MRN, které mají dostatečnou citlivost a specifitu pro to, aby mohly být využity v klinickém rozhodování o léčbě pacienta.

První z používaných metod je mnohobarevná průtoková cytometrie. Pomocí kombinací fluorescenčně značených protilátek proti povrchovým nebo cytoplazmatickým antigenům typickým pro nádorovou buňku umožňuje sledování MRN. Pomocí průtokové cytometrie je možné při optimalizaci dosáhnout citlivosti až  $10^{-4}$ . Nádorový klon je možné sledovat pomocí znaků, které jsou exprimovány buď asynchronně (netypicky pro očekávané vývojové stadium buněk), nebo aberantně (netypicky pro danou vývojovou linii buněk). Z toho také plynou nevýhody této jinak

rychlé a velice přehledné metody – možnost ztráty či změny exprese sledovaných znaků během vývoje nádorového klonu a odlišení některých typů blastů od fyziologických prekurzorů B-řady (Campana, Coustan-Smith, 1999).

Dalším cílem pro monitorování MRN jsou produkty chromozomálních translokací, které je možné detekovat na úrovni RNA transkriptu. Sledovanými molekulárními cíly mohou být buď fúzní geny a jejich produkty, anebo aberantně exprimované geny, vzniklé po chromozomální translokaci. Pro sledování MRN pomocí kvantifikace mRNA sledovaného genu se využívá RQ-RT-PCR. Kvantifikace mRNA nemonitoruje přímo množství nádorových buněk, ale hladinu exprese sledovaného genu. Takovýmto cílovým genem je například gen pro cyklin D1, který se jeví jako spolehlivý molekulární marker pro sledování MRN u pacientů s MCL. Bylo prokázáno, že sledování MRN pomocí kvantifikace genu pro cyklin D1 odráží klinický průběh onemocnění. U pacientů v remisi byla prokázána nízká hladina exprese cyklinu D1, zatímco zvýšení hladiny exprese cyklinu D1 v aspirátech BM predikuje riziko vzniku relapsu onemocnění. Tyto výsledky ukazují, že cyklin D1 je spolehlivý marker pro sledování MRN u pacientů s MCL a zároveň by se mohl stát vhodným indikátorem, predikujícím blížící se relaps či remisi onemocnění (Břízová et al., 2008). Výhodou metod pracujících s RNA je možnost společné analýzy více vzorků od různých pacientů pomocí jediného zavedeného RQ-RT-PCR systému. Nevýhodou práce s RNA je její nízká stabilita a snadná degradace, která s sebou přináší nutnost rychlého a opatrného zpracování vzorků a výběru vhodného kontrolního genu. Citlivost, které se dosahuje u této metody, může být při vhodné optimalizaci až  $10^{-6}$ .

Poslední metoda používá ke sledování MRN kvantitativní detekci klonálně specifických přestaveb genů pro Ig a T-buněčné receptory (TCR) na DNA úrovni. Tato metoda využívá klonálního původu nádoru, a protože všechny nádorové buňky daného klonu sdílejí stejnou přestavbu v genech pro Ig/TCR, je možné využít tuto specifickou přestavbu jako marker nádorových buněk. Přestavěné V(D)J segmenty genů pro Ig/TCR a jejich přechodové oblasti spolu s N-úseky vytvářejí unikátní znak specifický pouze pro daný nádorový klon. Při znalosti sekvencí přestavěných genů, které lze získat sekvenací DNA nádorových buněk, lze navrhnout klonálně specifické primery, které jsou následně využity v RQ-PCR. Kvantifikací nádorové DNA pomocí RQ-PCR dostáváme informaci o množství reziduálních nádorových buněk, tedy o hladině MRN. Hladina MRN odráží stav onemocnění a může přinést i prediktivní informace

o počínající remisi či naopak relapsu. Citlivost detekce reziduálních nádorových buněk touto metodou je  $10^{-4}$  až  $10^{-6}$ , vše je ovšem závislé na správné optimalizaci PCR systému. Hlavní nevýhodou této metody je možnost falešně pozitivního výsledku při PCR analýze. Na druhou stranu výhodou této metody oproti průtokové cytometrii zůstává stabilita přestaveb na DNA úrovni i v případě měnícího se fenotypu nádorové buňky v průběhu terapie a celkově vyšší senzitivita. Metoda není ovlivněna viabilitou analyzovaných buněk. Z těchto důvodů se tato metoda v posledních letech stává čím dál více využívanou, a to i přes svou značnou časovou, finanční i laboratorní náročnost (van der Velden et al., 2003; Pott et al., 2010). Také je možné detekovat MRN u některých maligních lymfoproliferací, pomocí kvantifikace charakteristické chromozomální translokace. Stejně jako přestavby Ig/TCR genů, tak i chromozomální translokace slouží jako marker nádorového klonu, který se dá použít pro kvantifikaci nádorové DNA pomocí RQ-PCR. Příkladem může být MCL a FL, u kterých se využívá charakteristických translokací t(11;14), respektive t(14;18) (Brüggemann et al., 2004).



### **3. MATERIÁL**

#### **3.1. Pacienti**

Retrospektivně jsme analyzovali vzorky pacientů s diagnózou MCL a FL, diagnostikovaných na Ústavu patologie a molekulární medicíny UK 2. LF a FN Motol.

Celkem bylo analyzováno 19 bioptických vzorků primárních nádorů (15x MCL, 4x FL). V 16 případech se jednalo o vzorky zmražené tkáně. Zbývající 3 diagnostické vzorky byly ve formě tkáně fixované etanolem a zalité do parafínu. Diagnostické vzorky byly podrobeny analýze klonality přestaveb genů IgH a IgK. Následně byly sekvenovány a analyzovány specifické přestavby IgH genů. U pacientů s MCL byla provedena detekce translokace t(11;14) v oblasti MTC.

V souboru 19 pacientů bylo celkem 9 mužů a 10 žen (věk 37-77 let, medián 64 let). Retrospektivně bylo analyzováno 37 aspirátů kostní dřeně (KD) od 12 pacientů s MCL. Vzorky byly odebrány před zahájením a/nebo v průběhu léčby. Jako negativní kontroly byla použita DNA z jaderných buněk periferní krve od celkem 8 zdravých dárců.

č.p.	p	diagnóza	druh tkáně	zpracování vz.	č. vz.	datum odběru
1	M	MCL	uzlina	zmraženo	1-1	25.11.2005
			KD		1-2	6.12.2005
			KD		1-3	24.2.2006
			KD		1-4	16.3.2006
2	M	MCL	uzlina	zmraženo	2-1	6.1.2004
			KD		2-2	11.12.2003
			KD		2-3	1.9.2004
			KD		2-4	8.12.2005
			KD		2-5	22.6.2006
			KD		2-6	8.3.2007
3	Ž	MCL	uzlina	zmraženo	3-1	29.9.2003
			KD		3-2	24.9.2003
			KD		3-3	4.12.2003
			KD		3-4	26.5.2004
			KD		3-5	6.4.2005
4	M	MCL	uzlina	zmraženo	4-1	3.2.2005
			KD		4-2	12.7.2001
			KD		4-3	23.10.2001
			KD		4-4	11.2.2003
			KD		4-5	5.5.2004
			KD		4-6	3.2.2005
5	M	MCL	uzlina	zmraženo	5-1	29.11.2005
			KD		5-3	14.4.2005
			KD		5-4	14.7.2006
6	Ž	MCL	uzlina	zmraženo	6-1	4.7.2007
			KD		6-2	19.7.2007
			KD		6-3	19.7.2007
			KD		6-4	31.10.2007
7	Ž	MCL	uzlina	zmraženo	7-1	25.11.2005
			KD		7-2	25.11.2005
			KD		7-3	17.2.2006
			KD		7-4	23.5.2006
8	Ž	MCL	uzlina	zmraženo	8-1	21.2.2005
			KD		8-2	3.2.2005
9	M	MCL	uzlina	parařín eth.fixace	9-1	12.2.2001
			KD		9-2	13.11.2002
			KD		9-3	3.4.2003
			KD		9-4	17.9.2003
			KD		9-5	21.1.2004
10	Ž	MCL	uzlina	parařín eth.fixace	10-1	19.12.2005
			KD		10-2	22.7.2005

11	Ž	MCL	uzlina	zmraženo	11-1	2.12.2009
			KD		11-2	27.7.2010
			KD		11-3	10.6.2011
			KD		11-4	24.8.2011
12	Ž	MCL	uzlina	zmraženo	12-1	26.6.2006
			KD		12-2	24.5.2007
			KD		12-3	18.9.2007
13	M	MCL	uzlina	zmraženo	13	29.8.2006
14	M	MCL	uzlina	zmraženo	14	25.5.2006
15	M	MCL	uzlina	zmraženo	15	25.7.2006
16	M	FL	uzlina	zmraženo	16	10.1.2007
17	Ž	FL	uzlina	parafin eth.fixace	17	1.2.2005
18	Ž	FL	uzlina	zmraženo	18	10.6.2011
19	Ž	FL	uzlina	zmraženo	19	10.6.2011

**Tab. č. 1 Přehled analyzovaných vzorků pacientů s MCL a FL.**

M- muž, Ž- žena, p-pohlaví; č.p.-číslo pacienta; KD- kostní dřeň

### **3.2. Roztoky a chemikálie**

#### **3.2.1. Roztoky a chemikálie použité při izolaci buněk z PK či KD osmotickou lýzou**

##### 1x Lyzační roztok pro erytrocyty

- 10x konc. Lyzační roztok (zásobní roztok)
- 41,45g  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 3,95g  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- 0,186g EDTA
- 500ml ster.  $\text{H}_2\text{O}$

##### PBS

- 8g  $\text{NaCl}$
- 0,2g  $\text{KCl}$
- 1,44g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 0,24g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 800ml ster.  $\text{H}_2\text{O}$
- upravit pH na 7,2 pomocí  $\text{HCl}$
- doplnit do 1000ml, rozplnit a autoklávovat

#### **3.2.2. Roztoky a chemikálie použité při izolaci DNA ze zmražené tkáně**

##### Trizol (Invitrogen)

##### chloroform (Sigma)

##### izopropanol (2 – propanol) (Sigma)

##### 75% ethanol (Merck)

##### 100% ethanol (Merck)

##### 0,1M citrát sodný v 10% ethanolu

- 10 ml ethanolu (Merck)
- 90 ml destilované vody
- 2,94 g citrátu sodného (Sigma)

#### **3.2.3. Roztoky a chemikálie použité při izolaci DNA z parafinových bloků**

##### xylén (Sigma)

##### 100% ethanol (Merck)

##### QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN)

### 3.2.4. Roztoky a chemikálie použité na elektroforézu

#### A) agarózový gel (1,5%)

agaróza (Promega)

100 bp DNA velikostní standard (1µg/µl) (Invitrogen)

ethidium bromid (10mg/ml) (Sigma)

Loading Buffer – (Applied Biosystems)

1x TBE pufr (TRIS – borát – EDTA)

- 10x TBE (zásobní roztok)

- 108g TRIS

- 55g kyseliny borité

- 40ml 0,5M EDTA, pH 8

Vše smíchat a doplnit do 1000ml destilovanou vodou.

Před použitím zředit 1:10.

#### B) polyakrylamidový gel (8%)

polymerační směs:

- destilovaná voda

- 5x TBE

- 40% akrylamid:bisakrylamid (29:1)

- 10% APS (amonium persulfáte)

- TEMED (tetramethylendiamin)

1x TBE

Loading Buffer – (Applied Biosystems)

100 bp DNA velikostní standard (1µg/µl) (Invitrogen)

ethidium bromid (10mg/ml) (Sigma)

### 3.2.5. Roztoky a chemikálie použité při PCR

A) kontrolních genů CTRL

B) detekce translokace t(11;14) v oblasti MTC

C) detekce klonality přestaveb genů IgH a IgK

destilovaná voda

10x PCR pufr (Applied Biosystems)

25mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems)

2mM dNTP (Invitrogen)

polymeráza Taq Gold 5U/μl (Applied Biosystems)

polymeráza Taq Purple 1U/μl (Top-Bio)

specifické primery (10 pmol/ μl) (Eastport)

### **3.2.6. Roztoky a chemikálie použité na přečištění produktů PCR**

Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid)

### **3.2.7. Roztoky a chemikálie použité při sekvenaci DNA a přečištění**

BDT v3.1 (Big Dye Terminator) (Applied Biosystems)

destilovaná voda

specifické primery (10 pmol/ μl) (Eastport)

75% izopropanol

Hi-Di formamid (Applied Biosystems)

### **3.2.8. Roztoky a chemikálie použité při optimalizaci RQ-PCR systému**

destilovaná voda

2x TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems)

10x PCR pufr (Applied Biosystems)

25mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems)

2mM dNTP (Invitrogen)

polymeráza Taq Gold 5U/μl (Applied Biosystems)

specifické primery (10 pmol/ μl) (Eastport)

specifické sondy (4 pmol/ μl) (Eastport)

BSA (hovězí sérový albumin) (20mg/ml)

### **3.3. Použitá laboratorní technika**

#### **Laboratorní technika pro elektroforézu**

elektroforetická vana HOEFER HE 33

elektrický zdroj CONSORT E865

UV transiluminátor ULTRA – LUM + detekční kamera (Paramount)

program Scion Image (Scion Corporation)

#### **Suché bloky**

AccuBlock™ Labnet

Unitek™ HB-130

#### **Centrifugy**

Hettich EBA12

Jouan BR4

#### **Přístroj pro PCR**

MJ Research PTC – 200

PE 2700

#### **Přístroj pro kvantitativní PCR**

Light Cycler 480 (Roche)

Light Cycler Software verze 4.05.

iQ Cycler (BioRad)

#### **Sekvenátor**

Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems)

software GeneScan (Applied Biosystems)

### 3.4. Přehled použitých primerů a hydrolyzačních sond

	primery	sekvence 5'-3'	orientace
<b>detekce klonality</b>			
<b>IgH</b>	VH1-FR1	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG	F
	VH2-FR1	GTCTGGTCCTACGCTGGTGAACCC	F
	VH3-FR1	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG	F
	VH4-FR1	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG	F
	VH5-FR1	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT	F
	VH6-FR1	TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG	F
	VH1-FR2	CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA	F
	VH2-FR2	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGG	F
	VH3-FR2	GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA	F
	VH4-FR2	TGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGG	F
	VH5-FR2	GGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAGG	F
	VH6-FR2	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG	F
	VH7-FR2	TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA	F
	VH1-FR3	TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA	F
	VH2-FR3	CAATGACCAACATGGACCCTGTGGA	F
	VH3-FR3	TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC	F
	VH4-FR3	GAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACG	F
	VH5-FR3	CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC	F
	VH6-FR3	GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG	F
	VH7-FR3	CAGCACGGCATATCTGCAGATCAG	F
	JH consensus	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	R
<b>IgK</b>	Vk1f	TCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTG	F
	Vk2f	GGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTC	F
	Vk3f	CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC	F
	Vk4	CAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTGTTT	F
	Vk5	CCTGCAAAGCCAGCCAAGACATTGAT	F
	Vk7	GACCGATTTACCCCTCACAATTAATCC	F
	INTR	CGTGGCACCGCGAGCTGTAGAC	F
	Jk 1-4	CTTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC	R
	Jk5	CTTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC	R
	Kde	CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCTA	R
<b>translokace MTC</b>	BCL1/MTC	GGATAAAGGCGAGGAGCATAA	F
	JH consensus	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	R
<b>kontrolní geny</b>			
<b>CTRL</b>	TBXAS1/X9U	GCCCGACATTCTGCAAGTCC	F
	RAG1/X2U	TGTTGACTCGATCCACCCCA	F
	PLZF/X1U	TGCGATGTGGTCATCATGGTG	F
	AF4/X11U	CCGCAGCAAGCAACGAACC	F
	AF4/X3U	GGAGCAGCATTCCATCCAGC	F
	TBXAS1/X9L	GGTGTGCGCGGAAGGGTT	R
	RAG1/X2L	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA	R
	PLZF/X1L	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC	R
	AF4/X11L	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC	R
	AF4/X3L	CATCCATGGGCGGACATAA	R



<b>RQ-PCR</b>			
<b>reverzní IgH konsenzus</b>	R-JH1	CGCTATCCCCAGACAGCAGA	R
	R-JH2	GGTGCCTGGACAGAGAAGACT	R
	R-JH3	AGGCAGAAGGAAAGCCATCTTAC	R
	R-JH4	CAGAGTTAAAGCAGGAGAGAGGTTGT	R
	R-JH5	AGAGAGGGGGTGGTGAGGACT	R
	R-JH6	GCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGT	R
<b>kontrolní gen-albumin</b>	ALB 5'	TGAAACATACGTTCCAAAGAGTTT	F
	ALB 3'	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT	R
<b>klonálně specifické primery</b>			
<b>FR1-IgH</b>	pacient 1	GAGAGGCGGTGGTTCGG	F
	pacient 2	GCGAGAGGAGGGCCTACATATT	F
	pacient 3	AGCAGTTTATTGCGGGTGGT	F
	pacient 4	TTGTGCGAAAGGTGCTGAATAC	F
	pacient 5	AGGCTACCAGCGTACCCGT	F
	pacient 6	GTAGTAGTACCAGCTGCTAAAATCTAC	F
	pacient 7	ATTGTAGTAGTAACGGCTGCTATGTTAG	F
	pacient 8	TGGAACCGACTACCGASATAAA	F
	pacient 9	GGGGGGTACGAATTACTATCTGT	F
	pacient 10	GCAGTGGCTGGTACGGAGAA	F
	pacient 11	GACCGGAGAATAGTGGGAGCTATT	F
	pacient 12	GTATTACTGTGCGAGACCTGGG	F
<b>t(11;14) v oblasti MTC</b>			
	pacient 3	CTGCCATTGGTGGA ACTCA	F
	pacient 4	TTATCTGCGTGGGATGTTTCG	F
	pacient 9	CGTGGGATGAGATTAACTGCA	F
	pacient 11	TTGGTTTGGATCTCTCGCCG	F
	pacient 12	ATTGGGGTTTTCTTGCGTG	F

<b>Hydrolyzační sondy</b>		<b>5'-FAM - TAMRA-3'</b>	
	ALB VIC	TGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGAT	
	TaqMan TJH 1.2.4.5	CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG	
	TaqMan TJH 3	CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA	
	TaqMan TJH 6	CACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAA	

**Tab. č. 2 Přehled použitých primerů a hydrolyzačních sond.**

#### **4. METODIKA**

##### **4.1. Izolace buněk z periferní krve či kostní dřeně osmotickou lýzou**

Vzorky aspirátů KD nebo PK, které jsou odebírány do sterilních zkumavek s protisrážlivým činidlem (EDTA) a při pokojové teplotě dodané do laboratoře, jsou podrobeny izolaci jaderných buněk pomocí osmotické lýzy erytrocytů, viz následující protokol.

- 1) vzorek přelít do falkony a zředit 5x v 1x konc. lyzačním roztoku
- 2) nechat vyčeřit vzorek v lednici 30-40 min., občas protřepat, změna barvy na světle červenou
- 3) centrifugovat 20 min., 2200 rpm (500 x g), 4°C
- 4) resuspendovat v 5 ml 1x konc.lyzačním roztoku
- 5) centrifugovat 10 min., 2200 rpm (500 x g), 4°C
- 6) slít supernatant a nechat osušit
- 7) resuspendovat v 5 ml PBS
- 8) opakovat bod 5) a 6)
- 9) resuspendovat v 1 ml PBS
- 10) rozpipetovat suspenzi z falkon do eppendorfek dle velikosti pelet
- 11) opakovat bod 5), slít supernatant a nechat okapat
- 12) vzorky buněk zamrazit v -80°C

## **4.2. Izolace nukleových kyselin (NK)**

### **4.2.1. Trizolová izolace DNA a RNA ze zmražené tkáně a jaderných buněk**

Výhodou metody izolace nukleových kyselin s použitím Trizolu je možnost současné izolace RNA i DNA z jednoho vzorku dodaného materiálu. Ke vzorku zmražené tkáně (kryostatové řezy, 10 řezů 5µm silných) nebo peletě jaderných buněk přidat 1000 µl Trizolu, resuspendovat pipetou se špičkou s filtrem a dostatečně vortexovat tak, aby se tkáň nebo peleta buněk na dně zkumavky zcela rozvolnila a následně pokračovat dle návodu na izolaci nukleových kyselin pomocí Trizolu (Life Technologies). Vzorky RNA uchovat při teplotě -80°C. Vzorky DNA uchovat při teplotě -20°C.

#### **4.2.1.1. Trizolová izolace RNA**

- 1) ke vzorku zmražené tkáně přidat 1ml Trizolu, vortexovat
- 2) inkubovat 5 min. při pokojové teplotě
- 3) přidat 200 µl chloroformu, protřepat otáčením zkumavky a následně cca 10s vortexovat
- 4) inkubovat 2-3 min. při pokojové teplotě
- 5) centrifugovat 15 min., 11 600 rpm (12000 x g), 4°C
- 6) odebrat supernatant opatrně do jiné eppendorfky, optimální je 400 µl
- 7) přidat 500µl isopropanolu, opatrně promíchat převrácením eppendorfky
- 8) inkubovat 10 min. při pokojové teplotě
- 9) centrifugovat 10 min., 11 600 rpm (12000 x g), 4°C
- 10) slít supernatant, osušit eppendorfku sterilním filtračním papírem
- 11) peletu opláchnout 1 ml 75% ethanolu, opatrně převracet eppendorfku a tím oddělit peletku od dna
- 12) centrifugovat 5 min., 9200 rpm (7500 x g)
- 13) supernatant slít, eppendorfku osušit na sterilním filtračním papíře
- 14) cca 15 min. nechat schnout dnem vzhůru
- 15) přidat 40 µl sterilizované vody
- 16) rozpustit peletu, 10 min. při teplotě 55-60°C (vodní lázeň či „heat block“)
- 17) označenou eppendorfku s RNA uschovat v mrazáku (-80°C)

#### 4.2.1.2. Trizolová izolace DNA

Navazujeme na bod 6) protokolu Trizolové izolace RNA.

- 1) odebrat interfázi (bílá sraženina) a částečně i vodnou fázi
- 2) přidat 500  $\mu$ l 100% ethanolu
- 3) dobře promíchat (zvortexovat) a nechat stát při pokojové teplotě 2 – 3 min.
- 4) centrifugovat 5 min., 5500 rpm (2000 x g), 4°C
- 5) opatrně slít supernatant
- 6) přidat 1 ml 0,1 M citrátu sodného v 10% ethanolu
- 7) 30 min. inkubovat při pokojové teplotě, během této doby několikrát vortexovat
- 8) centrifugovat 5 min., 5500 rpm (2000 x g), 4°C
- 9) slít supernatant
- 10) opakujeme kroky 6) až 9)
- 11) přidat 1 ml chlazeného 75% ethanolu, inkubovat 20 min. při pokojové teplotě
- 12) centrifugovat 5 min., 5500 rpm (2000 x g), 4°C
- 13) pipetou opatrně odstranit supernatant
- 14) nechat peletku oschnout (bez viditelného zbytku ethanolu)
- 15) resuspendovat peletu ve 100  $\mu$ l vody
- 16) rozpouštět 30 min. při 65°C
- 17) označenou eppendorfku s DNA uschovat v mrazáku (-20°C)

#### **4.2.2. Izolace DNA z tkáně fixované ve formolu/ethanolu a zalité v parafinových blocích**

U vzorků tkání zalitých v parafinu (parafinové řezy, 8-10 řezů 5µm silných) provést deparafinaci xylenem. Dále pak pokračovat dle návodu komerčně dostupného kitu QIAamp DNA Micro (QIAGEN) pro izolaci DNA. Izolovanou DNA uchovat při teplotě -20°C.

- 1) k eppendorfci s nakrájeným vzorkem přidat 1ml xylenu
- 2) vortexovat 10s
- 3) centrifugovat při max. otáčkách 2 min. při pokojové teplotě a slít supernatant
- 4) přidat 1 ml ethanolu (100%) a vortexovat
- 5) centrifugovat při max. otáčkách 2 min. při pokojové teplotě a slít supernatant
- 6) otevřít eppendorfku a inkubovat 10 min. při 37°C
- 7) přidat 180µl BUFFER ATL a resuspendovat peletu
- 8) přidat 20µl proteinázy K a vortexovat
- 9) inkubovat 1 hod. při 56°C
- 10) inkubovat 1 hod. při 90°C
- 11) rychle centrifugovat 1min., 8000 rpm (6000 x g)
- 12) přidat 200µl BUFFER AL
- 13) přidat 200µl ethanolu (100%) a vortexovat
- 14) rychle centrifugovat 1min., 8000 rpm (6000 x g)
- 15) přepipetovat (bez smáčení okrajů) lyzát na kolonu
- 16) centrifugovat 1 min., 8000 rpm (6000 x g)
- 17) dát kolonu do nové sběrné zkumavky
- 18) přidat 500µl BUFFER AW1 a centrifugovat 1 min., 8000 rpm (6000 x g)
- 19) dát kolonu do nové sběrné zkumavky
- 20) přidat 500µl BUFFER AW2 a centrifugovat 1 min., 8000 rpm (6000 x g)
- 21) dát kolonu do nové sběrné zkumavky
- 22) centrifugovat 3 min., 14 000 rpm (20 000 x g)
- 23) vložit kolonu do nové 1,5 eppendorfky a přidat 20-100µl BUFFER AE do středu membrány
- 24) inkubovat 1 min. při pokojové teplotě
- 25) centrifugovat 1 min., 14 000 rpm (20 000 x g)
- 26) eppendorfku s DNA uschovat v mrazáku (-20°C)

### 4.3. Gelová elektroforéza

Elektroforézu na agarózovém gelu využíváme při PCR kontrolních genů CTRL a také k detekci translokace t(11;14). Elektroforézu na polyakrylamidovém gelu využíváme k detekci klonality přestaveb genů pro imunoglobuliny.

#### 4.3.1. Agarózový gel

##### A. příprava 1,5% agarózového gelu

- ve 100 ml 1x TBE rozehtát v mikrovlnné troubě 1,5 g agarózy
- přidat 4 µl ethidium bromidu ( během míchání na míchačce )
- nalít do vaničky na gel, nasadit „ hřebínek “
- nechat 20 – 30 minut tuhnout, pak vytáhnout „ hřebínek “
- gel přenést do vaničky na elektroforézu, ve které je 1xTBE pufr

##### B. nanesení PCR produktu

- 6 µl PCR produktu smíchat s 2 µl vkladacího pufru a nanést do jamky
- jako poslední nanést 1,3 µl velikostního markeru (standard)

##### C. spuštění elektroforézy

- 130 V/ 40 minut

##### D.vizualizace v UV světle s následnou fotodokumentací

#### 4.3.2. Polyakrylamidový gel

##### A. příprava 8% polyakrylamidového gelu

- smíchat polymerizační směs
  - 47,2 ml dH<sub>2</sub>O
  - 16 ml 5x TBE
  - 16 ml 40% acryl/bisakryl 29:1
  - 0,8 ml 10% APS
  - 60 µl TEMED
- směs nalít mezi připravená skla s „hřebínkem“
- polymerace gelu 1 hodinu při pokojové teplotě
- poté přenést gel do elektroforetické vany a přidat 1x TBE pufr

##### B. nanesení PCR produktu

- do jamek nanést 20 µl vzorku po HDA smíchaného s vkladacím pufrem
- na poslední pozici nanést 2,6 µl markeru

### C. spuštění elektroforézy

- 300 V/ 2-3 hod.

### D. barvení gelu, vizualizace v UV světle a fotodokumentace

- barvit 40 min. v lázni TBE pufru s 1% ethidiem bromidem a poté vizualizovat v UV světle s následnou fotodokumentací

## 4.4. Amplifikace kontrolních genů CTRL metodou PCR

Pomocí metody PCR kontrolních genů je ověřena kvalita a integrita izolované DNA. Čerstvé či zmražené vzorky jsou ideální pro izolaci DNA, avšak někdy je nutno izolovat DNA ze vzorku fixovaného ve formolu a zalitého do parafrinového bloku. DNA izolovaná z takového vzorku bývá často degradována díky formolové fixaci, a proto je třeba ověřovat integritu DNA pomocí multiplex amplifikace několika kontrolních genů CTRL. Ke kontrolní amplifikaci DNA bylo navrženo 5 dvojic primerů, které amplifikují pomocí multiplex PCR produkty o velikosti 100, 200, 300, 400 a 600 bp (van Dongen et al., 2003). K vizualizaci a následnému vyhodnocení je využita agarózová elektroforéza, viz obrázek č. 12. Primery, reakční a teplotní podmínky jsou shrnuty v tabulce č. 3, 4 a 5.

Primery pro CTRL			
velikost produktu	sense	Antisense	koncentrace
100 bp	TBXAS1/X9U	TBXAS1/X9L	200 nM
200bp	RAG1/X2U	RAG1/X2L	200 nM
300bp	PLZF/X1U	PLZF/X1L	200 nM
400bp	AF4/X11U	AF4/X11L	200 nM
600bp	AF4/X3U	AF4/X3L	200 nM

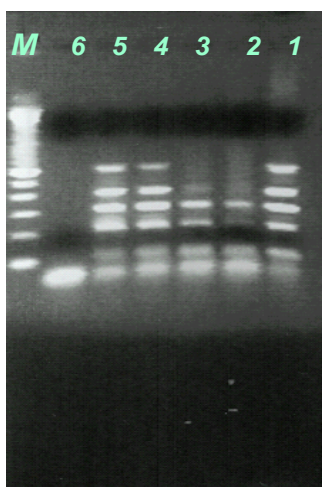
Tabulka č. 3 Primery využité při PCR kontrolních genů CTRL.

Reakční podmínky: (cílový objem 50µl)	
komponenta	konečná koncentrace
PCR pufr	1x
MgCl <sub>2</sub>	1,5 Mm
dNTP	200 µM
Taq Polymeráza Purple	1U
primery	viz tabulka č. 1

Tabulka č. 4 Reakční podmínky.

Teplotní režim PCR		
Program	teplota (°C)	čas (min)
denaturace	95°C	2:00
amplifikace - 35 cyklů	94°C	0:45
	60°C	0:45
	72°C	1:30
závěrečná extenze	72°C	10:00
chlazení	4°C	∞

**Tabulka č. 5 Teplotní režim pro PCR cyklér.**



#### CTRL

- 1 – zmražená tkáň ..... kvalitní DNA
- 2 – parafinový řez ..... částečně degradovaná DNA
- 3 – parafinový řez ..... částečně degradovaná DNA
- 4 – parafinový řez ..... kvalitní DNA (fixace v ethanolu)
- 5 – K+ ..... pozitivní kontrola
- 6 – H<sub>2</sub>O ..... negativní kontrola
- M – marker ..... 100bp DNA Ladder

**Obr. č. 12 Vizualizace CTRL na agarózovém gelu.**

#### 4.5. Detekce translokace t(11;14) a klonality přestaveb genů IgH a IgK

K detekci klonality přestaveb genů pro IgH a IgK je využito multiplex PCR podle mezinárodního protokolu (European BIOMED-2 collaborative study) (van Dongen et al., 2003). Podle stejného protokolu je také detekována chromozomální translokace t(11;14) v oblasti MTC. Přehled primerů, reakčních a teplotních podmínek je znázorněn v tabulce č. 6, 7 a 8. Schéma genového komplexu IgH a umístění primerů použitých při multiplex PCR je znázorněno na obrázku č. 14.

Detekce klonality probíhá pomocí multiplex PCR, vzniklé produkty jsou poté podrobeny heteroduplexní analýze a následně vizualizovány na akrylamidovém gelu. Produkty vzniklé při detekci translokace t(11;14) jsou vizualizovány na agarózovém gelu, viz obrázek č. 13. Jako negativní DNA se používá „buffy coat“ (BC), směs DNA izolovaná od zdravých dárců krve.



### A) detekce translokace t(11;14) v oblasti MTC

Primery pro detekci t(11;14)			
velikost produktu	sense	antisense	koncentrace
150-2000bp	BCL1/MTC	JHc	200 nM

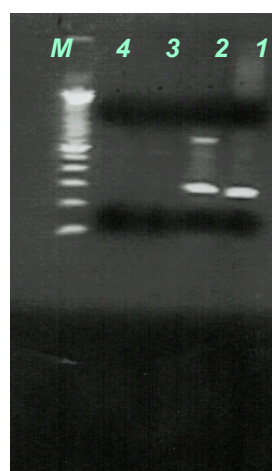
Tab. č. 6 Specifické primery pro detekci translokace t(11;14) v oblasti MTC

Reakční podmínky: (cílový objem 50µl)	
komponenta	konečná koncentrace
PCR pufr	1x
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTP	200 µM
Taq Polymeráza Gold	1U
primery	viz tabulka č. 1

Tabulka č. 7 Reakční podmínky.

Teplotní režim PCR		
Program	teplota (°C)	čas (min)
denaturace	95°C	8:00
amplifikace - 35 cyklů	94°C	0:45
	60°C	0:45
	72°C	1:30
závěrečná extenze	72°C	10:00
chlazení	15°C	∞

Tabulka č. 8 Teplotní režim pro PCR cyklér.



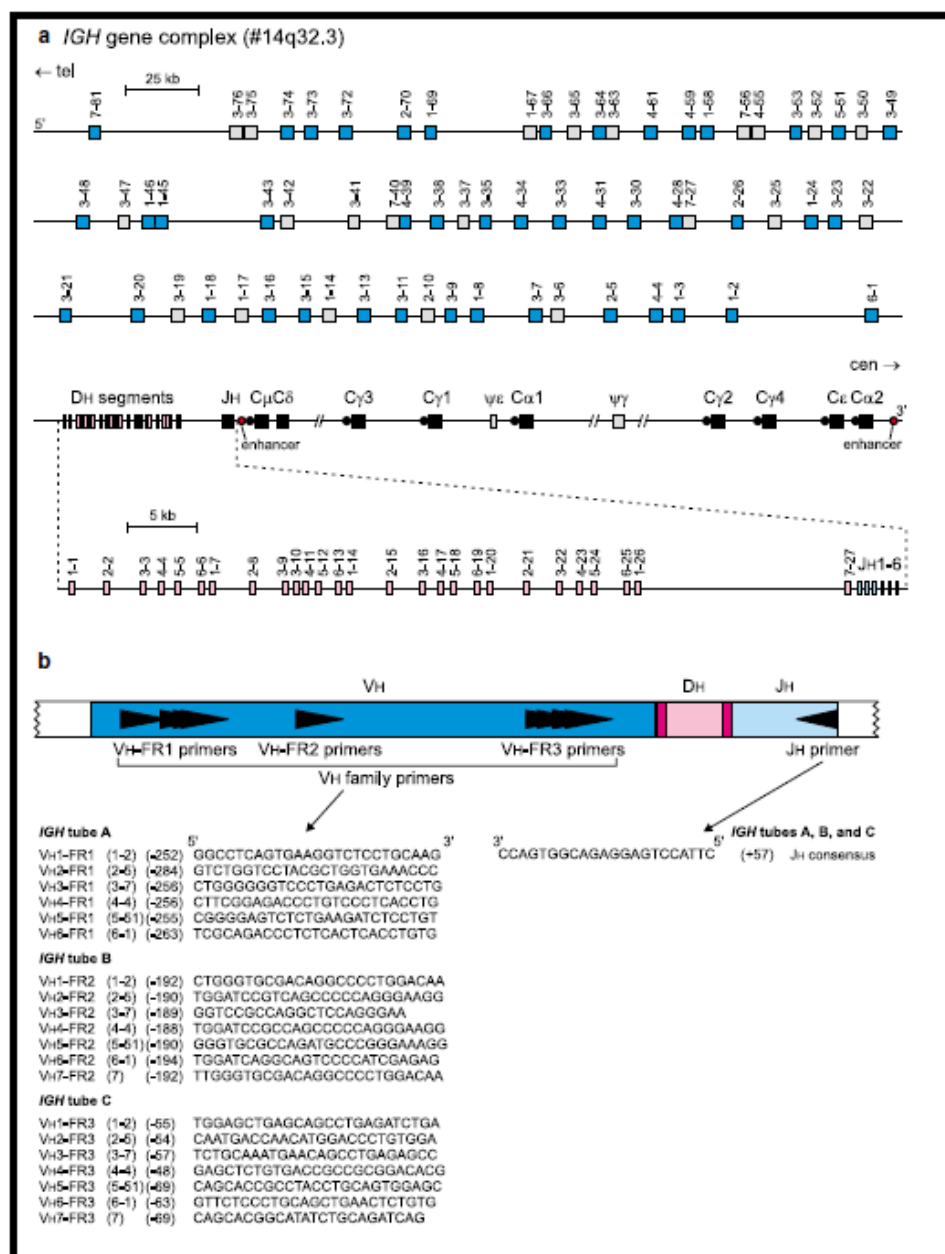
#### t(11;14)

- 1 – zmražená tkáň ..... pozitivní, průkaz translokace
- 2 – K<sup>+</sup> ..... pozitivní kontrola
- 3 – BC ..... buffy coat
- 4 – H<sub>2</sub>O ..... negativní kontrola
- M – marker ..... 100bp DNA Ladder

Obr. č. 13 Vizualizace t(11;14) na agarózovém gelu.

## B) detekce klonality přestaveb genů pro IgH a IgK

K detekci klonality jsou použity stejné reakční podmínky a teplotní režim PCR cyklů jako u detekce translokace t(11;14) viz tabulka č. 7 a 8. Tabulka č. 9 shrnuje použité primery v multiplex PCR. Na obrázku č. 15 a 16 je vizualizace IgH/IgK klonality na akrylamidovém gelu.

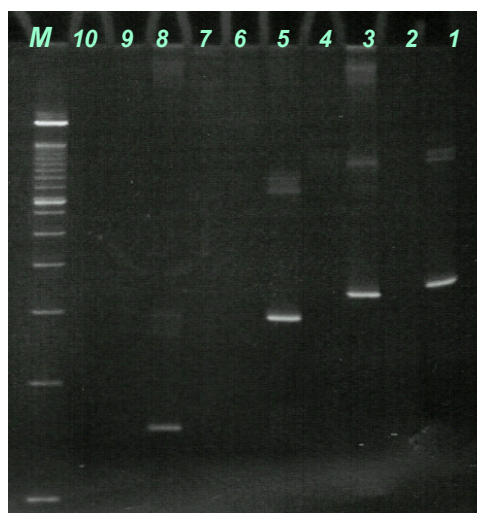


Obr. č. 14 Detekce klonality pomocí PCR analýzy genového komplexu IgH

V horní části obrázku a) je schéma genového komplexu IgH na chromozomu 14q32.3 s vyznačenými V, D a J segmenty a také se segmenty kódujícími konstatní řetězce. V části b) je znázorněno umístění „forward“ a „reverse“ primerů použitých při multiplex PCR.

Primery pro detekci klonality přestaveb IgH a IgK							
	velikost produktu	sense	Antisense		velikost produktu	sense	antisense
<b>IgH</b>				<b>IgK</b>			
směs A	320-355 bp	VH1-FR1 VH2-FR1 VH3-FR1 VH4-FR1 VH5-FR1 VH6-FR1	JHc	směs A	120-300 bp	Vk1f Vk2f Vk3f Vk4 Vk5 Vk7	Jk 1-4 Jk5
směs B	250-290 bp	VH1-FR2 VH2-FR2 VH3-FR2 VH4-FR2 VH5-FR2 VH6-FR2 VH7-FR2	JHc	směs B	210-390 bp	Vk1f Vk2f Vk3f Vk4 Vk5 Vk7 INTR	Kde
směs C	120-150 bp	VH1-FR3 VH2-FR3 VH3-FR3 VH4-FR3 VH5-FR3 VH6-FR3 VH7-FR3	JHc				

**Tab. č. 9 Přehled velikostí produktů a specifických primerů použitých v multiplex PCR při detekci klonality přestaveb Ig genů.**



Obr. č. 15 Vizualizace IgH klonality.

## IgH

### směs A

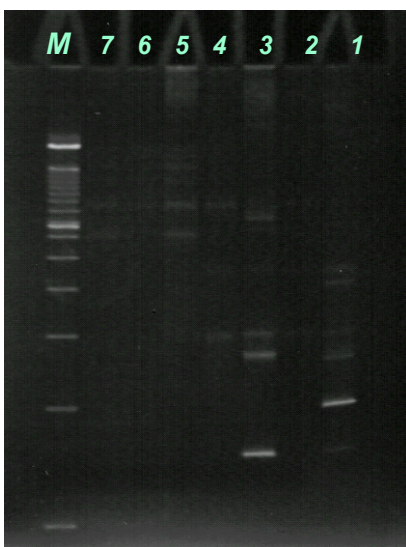
- 1 – zmražená tkáň ..... pozitivní
- 2 – kostní dřeň ..... negativní
- 3 – K+ ..... pozitivní kontrola
- 4 – BC ..... negativní

### směs B

- 5 – zmražená tkáň ..... pozitivní
- 6 – kostní dřeň ..... negativní
- 7 – BC

### směs C

- 8 - zmražená tkáň ..... pozitivní
- 9 – kostní dřeň ..... negativní
- 10 – BC ..... negativní
- M – marker ..... 100bp DNA Ladder



Obr. č. 16 Vizualizace IgK klonality.

## IgK

### směs A

- 1 – zmražená tkáň ..... pozitivní
- 2 – kostní dřeň ..... negativní
- 3 – K+ ..... pozitivní kontrola
- 4 – BC ..... negativní

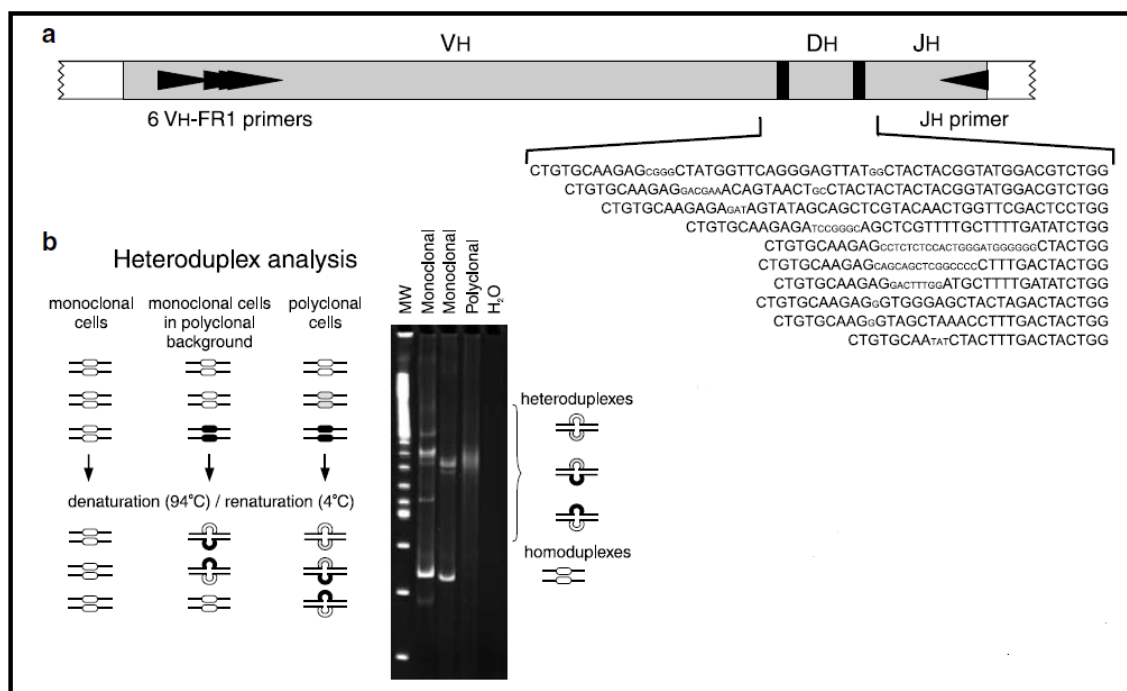
### směs B

- 5 – zmražená tkáň ..... negativní
- 6 – kostní dřeň ..... negativní
- 7 – BC ..... negativní

- M – marker ..... 100bp DNA Ladder

#### 4.6. Heteroduplexní analýza

Po PCR reakci produktů přeskupených imunoglobulinových řetězců je třeba odlišit klony buněk s identickými přechodovými oblastmi od polyklonálních lymfoidních buněk, které se vyznačují vysokou diverzitou přechodových oblastí. Při malých rozdílech v délce těchto oblastí nelze na agarózovém gelu rozlišit, zda jde o směs různě dlouhých produktů nebo o jediný produkt. Z tohoto důvodu se využívá metoda označená jako heteroduplexní analýza (HDA). Při HDA se PCR produkty nechají denaturovat při teplotě 95°C po dobu 5 minut a poté následuje rychlá renaturace při teplotě 4°C po dobu 1 hod. Během této fáze dochází ke vzniku charakteristických duplexů. Monoklonální buňky, které mají identické přechodové oblasti, vytvářejí homoduplexy, zatímco při polyklonalitě dochází ke vzniku heteroduplexů. Produkty jsou následně naneseny na 8% polyakrylamidový gel. Monoklonální produkty díky stejné rychlosti migrace vytváří jasný proužek, kdežto heteroduplexy, vzniklé náhodným spojením polyklonálních produktů, migrují v gelu pomaleji a vytváří neostře ohraničený široký pruh. Vznik homo/heteroduplexů a vizualizace na polyakrylamidovém gelu jsou znázorněny na obrázku č. 17.



**Obr. č. 17 Heteroduplexní analýza klonality přechodových oblastí IgH. Upraveno z van Dongen et al., 2003.**

**a)** schéma přechodových oblastí IgH, které mohou být amplifikované za účelem detekce klonality

**b)** vznik homo/heteroduplexů při HDA a vizualizace na polyakrylamidovém gelu

#### **4.7. Přečištění produktů PCR**

Před sekvenací PCR produktů vzniklých amplifikací přechodových oblastí genů pro IgH, je třeba produkty přečistit. Přečištění PCR produktů se provádí pomocí komerčního kitu (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, Genaid) dle následujícího protokolu.

- 1) přidat 5 objemových jednotek DF pufru k 1 objemové jednotce PCR vzorku
- 2) přepipetovat směs do kolony s filtrem
- 3) centrifugovat 1 min., 14 000 rpm (20 000 x g)
- 4) slít stočený objem ze zásobní kolony
- 5) přidat 600 µl WASH pufru do středu kolony a nechat 1 min stát při pokoj. teplotě
- 6) centrifugovat 1 min., 14 000 rpm (20 000 x g)
- 7) slít stočený objem a centrifugovat 3 min., 14 000 rpm (20 000 x g)
- 8) vložit suchou kolonu s filtrem do připravené 1,5 ml eppendorfky
- 9) přidat 50 µl ELUTION pufr do středu kolony a nechat 2 min stát při pokoj. teplotě
- 10) centrifugovat 2 min., 14 000 rpm (20 000 x g)
- 11) přečištěný PCR produkt uchováváme při -20°C

#### **4.8. Sekvenační reakce a přečištění produktů sekvenace**

Sekvenace přeskupených genových segmentů a přechodových oblastí IgH je klíčovým krokem pro určení sekvenace DNA. Sekvenace byla provedena na čtyřkapilárovém sekvenátoru Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) a vyhodnocení sekvencí v programu Genescan (Applied Biosystems).

##### **A) sekvenační reakce**

- 1) připravit 0,2 ml eppendorfky
- 2) přidat 1,5 µl BDT v. 3.1
- 3) přidat 1 µl specifického primeru (závisí na orientaci sekvenace)
- 4) do směsi přidat 5 µl teplátové DNA (přečištěný PCR produkt)
- 5) vortexovat a stočit na minicentrifuze
- 6) sekvenační reakce viz tabulka č. 10

<b>Teplotní režim PCR sekvenační reakce</b>		
Program	teplota (°C)	čas (min)
amplifikace - 30 cyklů	96°C	0:10
	50°C	0:05
	60°C	4:00
chlazení	4°C	∞

**Tab. č. 10 Teplotní režim PCR sekvenační reakce.**

### **B) přečištění produktů sekvenační reakce**

- 1) sekvenční směs smíchat s 80 µl 75% izopropanolu a zvortexovat
- 2) 15 min nechat srážet ve tmě při pokojové teplotě
- 3) centrifugovat 20 min., 14 000 rpm (20 000 x g), 4°C
- 4) odsát supernatant
- 5) přidat 250 µl 75% izopropanolu a vortexovat
- 6) centrifugovat 5 min., 14 000 rpm (20 000 x g), 4°C
- 7) odsát úplně supernatant
- 8) nechat vyschnout 30 min.

### **C) příprava vzorku před analýzou v sekvenátoru**

- 1) přidat 25 µl foramidů
- 2) vortexovat a stočit na minicentrifuze
- 3) přepipetovat do připravené sekvenační destičky
- 4) vložit do sekvenátoru

#### 4.9. Vyhodnocení sekvenace a návrh klonálně specifických primerů

K vyhodnocení sekvenace přeskupených imunoglobulinových segmentů se používá program Chromas v 1.5 (Technelysium), viz obrázek č. 18. Sekvenci je třeba prohlédnout, porovnat sekvenace z obou stran a zkontrolovat správnost. Je nutné kontrolovat, zda jsou nukleotidy správně přečteny a vyhodnoceny, a zda nedošlo k případnému ukončení sekvenace či jiným technickým problémům.

Dalším krokem je srovnání sekvenace vzorku se zárodečnou (germline) sekvencí imunoglobulinových genů. Porovnání sekvencí je provedeno v blastových databázích (IMGT database)<sup>2</sup> a (NCBI IgBLAST)<sup>3</sup>. Výsledkem porovnání sekvencí je určení segmentů a N-sekvencí mezi představěnými segmenty. Následně pracujeme v programu Vector NTI Advance 11 (Invitrogen), viz obrázek č. 19, kde lze vyznačit vzájemnou polohu V(D)J segmentů a přechodových N-úseků. Právě N-úseky jsou klíčové pro navrhování klonálně specifických primerů, které jsou použity v RQ-PCR při detekci MRN.

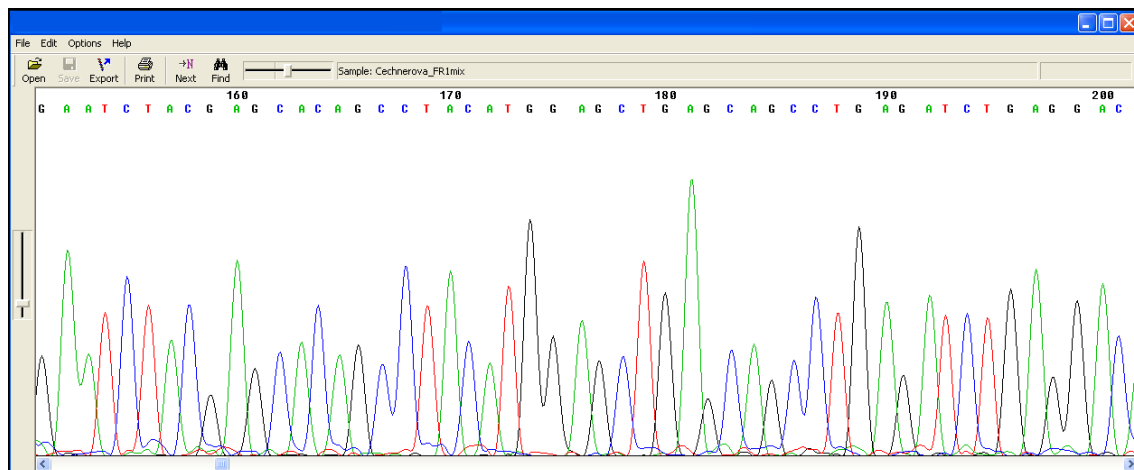
Návrh klonálně specifických primerů pro sledování MRN se řídí několika pravidly. Navrhují se „forward“ primery, reverzní primery a hydrolyzační sondy pro RQ-PCR jsou společné pro daný genový J segment. Například pokud je sekvenací zjištěno, že nádorový klon nese představbu se segmenty IGHV1-IGHD2-IGHJ3, pak je navržen vhodný specifický „forward“ primer a použit reverzní primer a hydrolyzační sonda specifická pro JH3 segment.

---

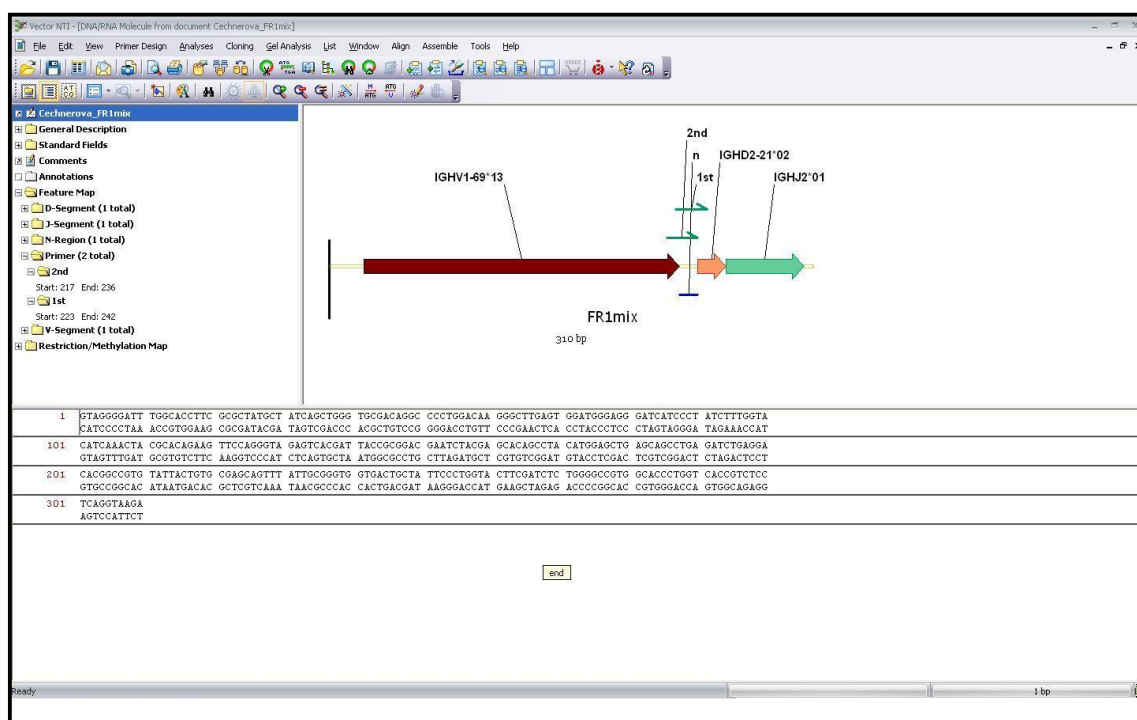
<sup>2</sup>Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/> [online]. [cit. 2012-02-20].

<sup>3</sup> Dostupné z: <http://www.imgt.org/> [online]. [cit. 2012-02-20].





**Obr. č. 18** Vyhodnocení sekvence přestavěných IgH genů v programu Chromas v. 1.5.



**Obr. č. 19** Návrh klonálně specifických primerů a vyznačení V, D, J segmentů a N-úseků v programu Vector NTI Advance 11.

### **Pravidla pro návrh specifických primerů:**

- 1) primer by měl začínat v „germline“ V či D segmentu a končit v N-úseku; pokud končí primer v D či J segmentu, tak by neměl přesahovat více jak 6 bp do segmentu
- 2) teplota tání ( $T_m$ ) primeru by měla být přibližně stejná jako u reverzního primeru (cca 54°C), maximální rozdíl  $T_m$  primerů by měl činit 5°C
- 3) zkontrolovat tvorbu dimerů a vlásenek, max. energie dimerů  $\Delta G$  do -5 kcal/mol
- 4) konce primerů by neměly být příliš bohaté na GC páry
- 5) zkontrolovat vznik možných nespecifit s reverzním primerem a hydrolyzační sondou

I při zachování všech těchto pravidel zůstává návrh klonálně specifických primerů empirickou záležitostí. Teoreticky dobře navržený primer, splňující všechna pravidla, není zárukou úspěchu při praktickém použití. Je proto výhodou navrhnout pro každý systém minimálně dva klonálně specifické primery.

### **4.10. Optimalizace RQ-PCR systému a detekce MRN**

Pro detekci MRN u pacientů s maligními lymfomy je nutné zavést a optimalizovat RQ-PCR systém. V první fázi jsou testovány klonálně specifické primery, zda vykazují dostatečnou specifitu a senzitivitu a jsou schopny správně amplifikovat DNA v ředící řadě  $10^{-1}$  až  $10^{-5}$  nádorových buněk ve směsi BC. Je nutné, aby optimalizovaný systém splňoval všechna kritéria ESG-MRD-ALL (European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia), viz dále.

Z diagnostického vzorku pacienta je vytvořena ředící řada, dle koncentrace DNA a množství nádorových buněk, která slouží k testování klonálně specifických primerů a následné optimalizaci RQ-PCR systému. Poté, co je systém vhodně optimalizován a splňuje kritéria ESG-MRD-ALL, se přistoupí k RQ-PCR kvantifikaci reziduálních vzorků pacienta.

K určení koncentrace DNA reziduálních vzorků je nezbytná kvantifikace kontrolního genu. Naše laboratoř, stejně jako většina ostatních, používá jako kontrolní gen albumin. Pomocí standardní kalibrační křivky, získané z DNA BC, se kvantifikuje množství genu pro lidský albumin. Výsledky hladin MRN jsou normalizovány jako poměr hodnot klonálně specifických přestaveb k hodnotě albuminu.

Návrh specifických primerů, změny teplotních režimů a koncentrací primerů, hydrolyzačních sond a  $Mg^{2+}$  v experimentálním schématu, to vše přispívá k optimalizaci a zavedení vhodného RQ-PCR systému. Vysoké nároky jsou kladeny především na senzitivitu a specifitu systému. Výzkumná skupina ESG-MRD-ALL, rovněž nazývaná Euro-MRD, která definovala kritéria pro detekci hladin MRN, sdružuje 43 mezinárodních laboratoří zabývajících se sledováním MRN. Členem této skupiny je také naše laboratoř, která zastává lymfomovou sekci, spolupracující v tomto projektu s Prof. MUDr. Janem Trkou, Ph.D. z kliniky dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol.

### **Kritéria ESG-MRD-ALL (EURO-MRD)**

#### **Standardní křivka:**

- ředící řada diagnostického vzorku DNA je vytvořena ředěním do směsi DNA získané z jaderných buněk od nejméně pěti zdravých osob
- požadovaný rozsah ředění od  $10^{-1}$  do nejméně  $10^{-5}$
- nutno minimálně 3 diluční body
- testovat nejméně v duplikátech; v případě triplikátů se bere v úvahu průměr všech hodnot

#### **Pozadí:**

- je definováno jako nespecifická amplifikace nenádorové DNA
- dáno analýzou směsi DNA od nejméně 5 zdravých jedinců (BC)
- testování DNA BC provedeno minimálně v hexaplikátech

### **Kritéria pro rozmezí kvantifikace RQ-PCR**

Rozmezí kvantifikace je nejnižší ředění, které:

- se specificky amplifikuje (dobré amplifikační křivky)
- má rozdíl Ct replikátů  $\leq 1,5$
- musí mít průměrné hodnoty Ct o 2,6-4 cykly větší než předchozí 10x nižší ředění (nebo 0,5-1,5 cyklu vyšší než předchozí 5x nižší ředění)
- musí mít všechny hodnoty Ct nejméně o 3 cykly nižší než nejvyšší Ct hodnota pozadí
- standardní křivka musí mít sklon mezi -3,1 a -3,9 a korelační koeficient  $\geq 0,98$

### **Kritéria pro senzitivitu RQ-PCR**

Senzitivitou PCR rozumíme nejvyšší ředění, které:

- se specificky amplifikuje (dobré amplifikační křivky)
- má nejméně jeden vzorek z replikátu pozitivní; rozdíl Ct („threshold cycle“) replikátů nerozhoduje
- má nejvyšší Ct replikátů v rozmezí 20 cyklů od Ct neředěného vzorku nebo má nejvyšší Ct replikátů v rozmezí 20 cyklů od interceptu standardní křivky
- má nejméně jednu hodnotu Ct o nejméně jeden cyklus nižší než nejvyšší Ct hodnota pozadí

### **Analýza MRN v daném vzorku**

Hodnotu MRN ve vzorku lze určit numericky ze standardní křivky s korekcí podle kontrolního genu, jestliže:

- průměrná Ct hodnota replikátů  $\leq$  nejvyšší Ct rozmezí kvantifikovatelnosti a  $\Delta$  Ct replikátů vzorku je  $\leq 1.5$ .

Pokud je průměrná Ct hodnota replikátů  $\geq$  nejvyšší Ct rozmezí kvantifikace, hodnotí se vzorek pouze jako "pozitivní" s udávanou hodnotou  $10^{-6}$ .

Vzorek je dále pokládán za pozitivní, pokud:

- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je v rozmezí 4 cyklů od senzitivity systému
- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je o  $\geq 1.0$  nižší než nejvyšší Ct pozadí.

## **5. VÝSLEDKY**

### **5.1. Detekce klonality a translokace t(11;14) v oblasti MTC**

Detekce klonality byla provedena pomocí standardizované PCR analýzy přestavěných genů kódujících IgH a IgK (van Dongen et al., 2003). Všechny 19 pacientů (15 MCL, 4 FL) vykazovalo pozitivitu při detekci klonality genu pro IgH. U 13 z 19 (68%) pacientů byla detekována také klonální přestavba genu kódujícího IgK. Specifické přestavby genů pro IgH a IgK byly vybrány jako vhodný molekulární cíl pro sledování a stanovení hladiny MRN.

U pacientů s MCL byla provedena detekce translokace t(11;14) v oblasti MTC dle standardizovaného protokolu (van Dongen et al., 2003). Přítomnost t(11;14) v oblasti MTC byla prokázána u 6 z 15 (40%) pacientů. U pacientů, kteří sdílejí jak specifickou přestavbu v genech pro Ig, tak translokaci t(11;14) MTC se nabízí možnost sledovat hladinu MRN pomocí dvou nezávislých molekulárních cílů. Výsledek detekce klonality a translokace t(11;14) je uveden v tabulce č. 11.

číslo pacienta	diagnóza	detekce klonality přestaveb genů pro imunoglobuliny		detekce translokace t(11;14) v oblasti MTC
		IGH	IGK	
1	MCL	poz.	neg.	neg.
2	MCL	poz.	poz.	neg.
3	MCL	poz.	poz.	poz.
4	MCL	poz.	neg.	poz.
5	MCL	poz.	neg.	neg.
6	MCL	poz.	poz.	neg.
7	MCL	poz.	poz.	neg.
8	MCL	poz.	poz.	neg.
9	MCL	poz.	neg.	poz.
10	MCL	poz.	poz.	neg.
11	MCL	poz.	poz.	poz.
12	MCL	poz.	poz.	poz.
13	MCL	poz.	poz.	neg.
14	MCL	poz.	poz.	poz.
15	MCL	poz.	poz.	neg.
16	FL	poz.	neg.	-
17	FL	poz.	poz.	-
18	FL	poz.	poz.	-
19	FL	poz.	neg.	-

**Tab. č. 11 Výsledky detekce klonality a translokace t(11;14) v oblasti MTC u pacientů s MCL a FL.**

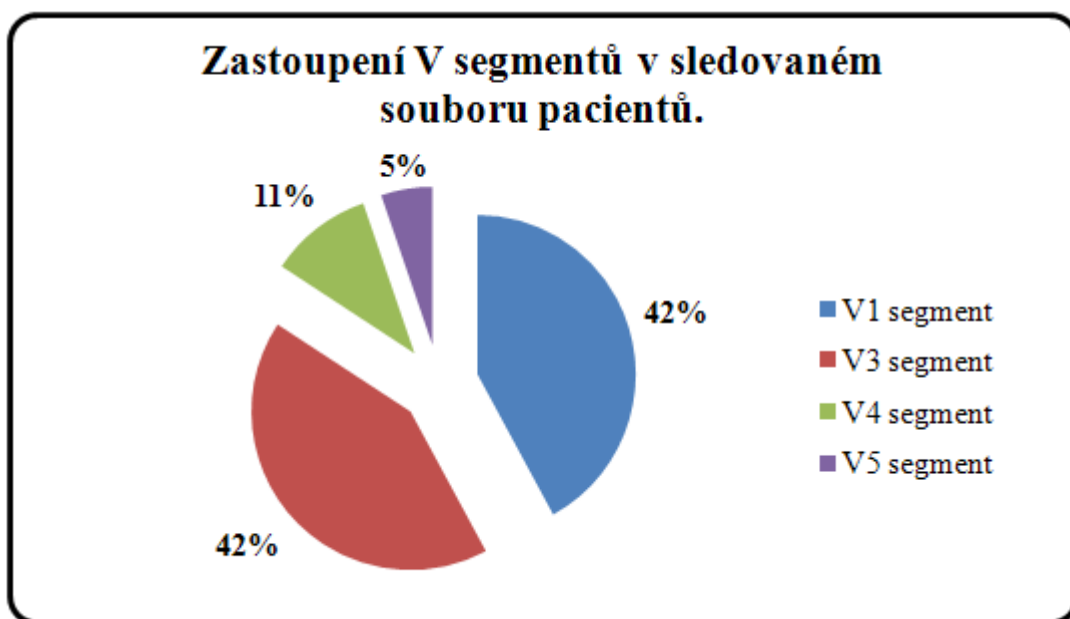
## **5.2. Analýza přestaveb genů pro IgH a zastoupení jednotlivých rodin V, D, J segmentů**

U 19 pacientů (15 MCL; 4FL) byly pomocí databází IMGT a NCBI IgBlast analyzovány typy segmentů, které jsou obsaženy ve specifické klonální přestavbě genů pro IgH. Nejčastější výskyt v případě V-segmentů byl zaznamenán u rodiny IGHV1 a IGHV3 (zastoupení obou v souboru 42%). Méně časté byly segmenty typu IGHV4 (11%) a IGHV5 (5%). Segmenty typu IGHV6 a IGHV7 nebyly v sledovaném souboru pacientů detekovány. Analýza byla zaměřena nejen na rodinu daného segmentu, ale také na subtypy, které jsou velmi početné především u segmentů IGHV1, IGHV2, IGHV3 a IGHV4. Subtypy dané rodiny jsou si sekvenčně velmi podobné a v některých případech je velmi obtížné je od sebe odlišit. Při analýze V-segmentů se nejčastěji vyskytoval subtyp IGHV1-8 a IGHV3-23. Majoritní zastoupení u D-segmentů mají segmenty IGHD3 (42%). Dále byly detekovány segmenty typu IGHD1 (21%), IGHD2 (16%), IGHD4 (10,5%) a IGHD6 (10,5%). Nejčastější subtypy D-segmentů jsou IGHD3-3 a IGHD1-26. U J-segmentů byly v klonálních přestavbách nejvíce uplatněné segmenty IGHJ4 (53%) poté následovaly typy IGHJ5 (21%), IGHJ2 (16%) a segmenty IGHJ3 a IGHJ6 se zastoupením 5% z celkového souboru. Nejčastěji byl v souboru zastoupen subtyp IGHJ4-2. Přehled všech přeskupených segmentů klonálních přestaveb je znázorněn v tabulce č. 12. Procentuální zastoupení jednotlivých rodin V, D, J segmentů u celého souboru pacientů je zobrazeno v grafech č. 1, 2 a 3.

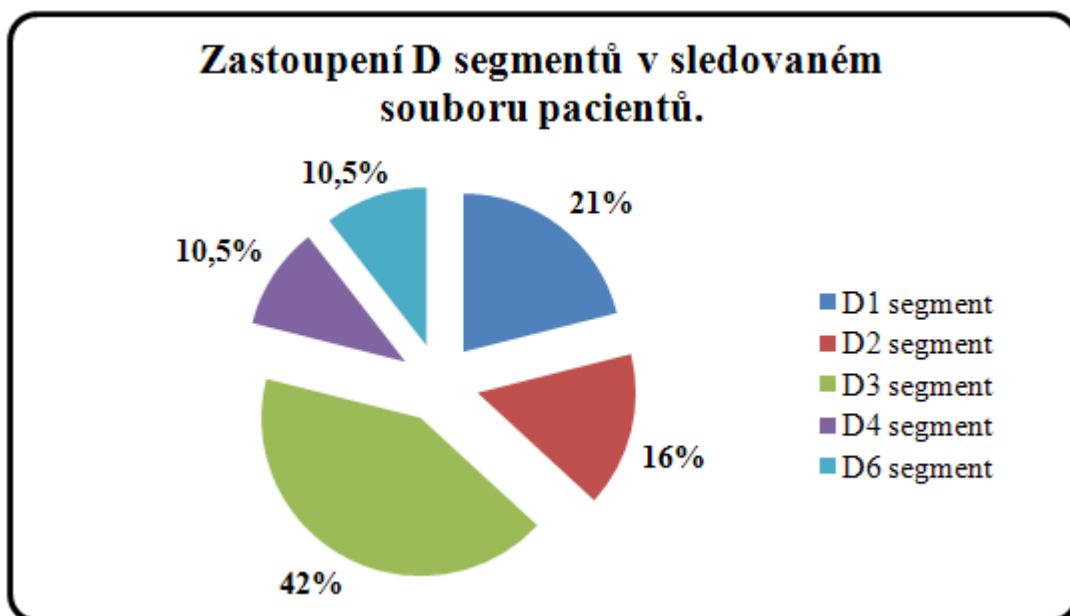


		přestavby genů IgH		
číslo pacienta	diagnóza	IGH-V	IGH-D	IGH-J
1	MCL	IGHV1-8*01	IGHD3-10*01	IGHJ4*02
2	MCL	IGHV3-48*03	IGHD3-3*01	IGHJ4*02
3	MCL	IGHV1-69*13	IGHD2-21*02	IGHJ2*01
4	MCL	IGHV3-30*18	IGHD4-17*01	IGHJ4*02
5	MCL	IGHV1-8*01	IGHD1-26*01	IGHJ4*02
6	MCL	IGHV4-34*02	IGHD2-2*03	IGHJ6*02
7	MCL	IGHV3-23*04	IGHD2-2*03	IGHJ4*02
8	MCL	IGHV1-8*01	IGHD1-7*01	IGHJ2*01
9	MCL	IGHV3-23*04	IGHD3-22*01	IGHJ4*02
10	MCL	IGHV1-69*10	IGHD6-19*01	IGHJ5*02
11	MCL	IGHV1-8*02	IGHD1-26*01	IGHJ4*02
12	MCL	IGHV1-8*01	IGHD3-16*01	IGHJ3*02
13	MCL	IGHV5-51*01	IGHD3-16*02	IGHJ2*01
14	MCL	IGHV4-59*08	IGHD4-17*01	IGHJ5*02
15	MCL	IGHV3-21*02	IGHD1-26*01	IGHJ5*02
16	FL	IGHV1-18*01	IGHD3-16*01	IGHJ4*02
17	FL	IGHV3-64*05	IGHD6-13*01	IGHJ5*02
18	FL	IGHV3-7*03	IGHD3-3*02	IGHJ4*02
19	FL	IGHV3-9	IGHD3-3*02	IGHJ4*02

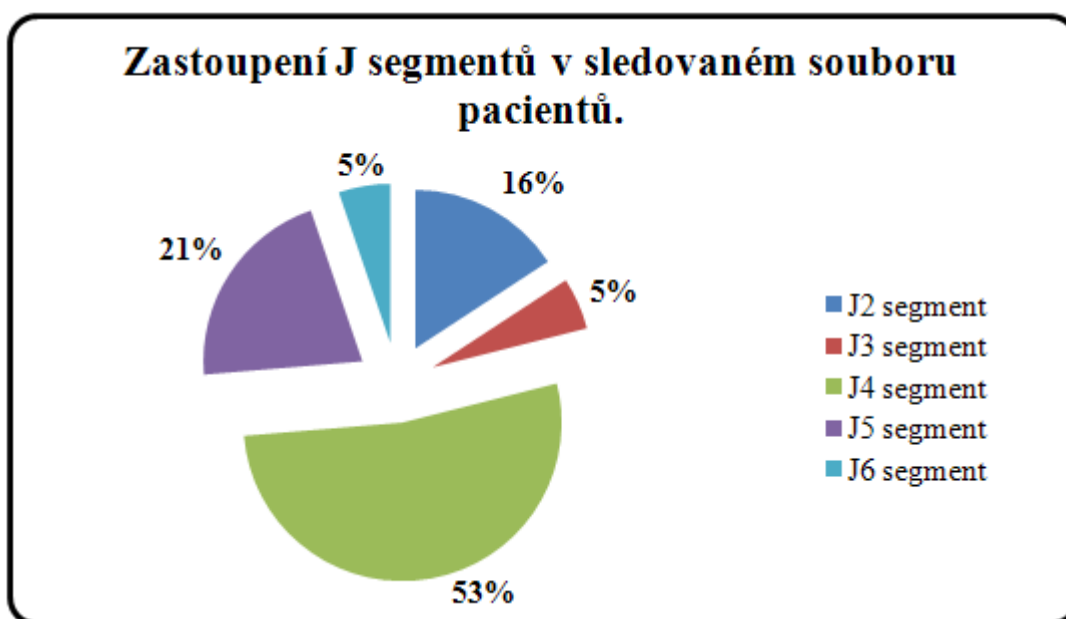
**Tab. č. 12 Přehled genových segmentů, které se vyskytují v přestavbách genu pro IgH u pacientů s MCL a FL. Analyzováno dle NCBI IgBLAST a IMGT database.**



Graf č. 1 Zastoupení V segmentů v sledovaném souboru pacientů s MCL a FL.



Graf č. 2 Zastoupení D segmentů v sledovaném souboru pacientů s MCL a FL.

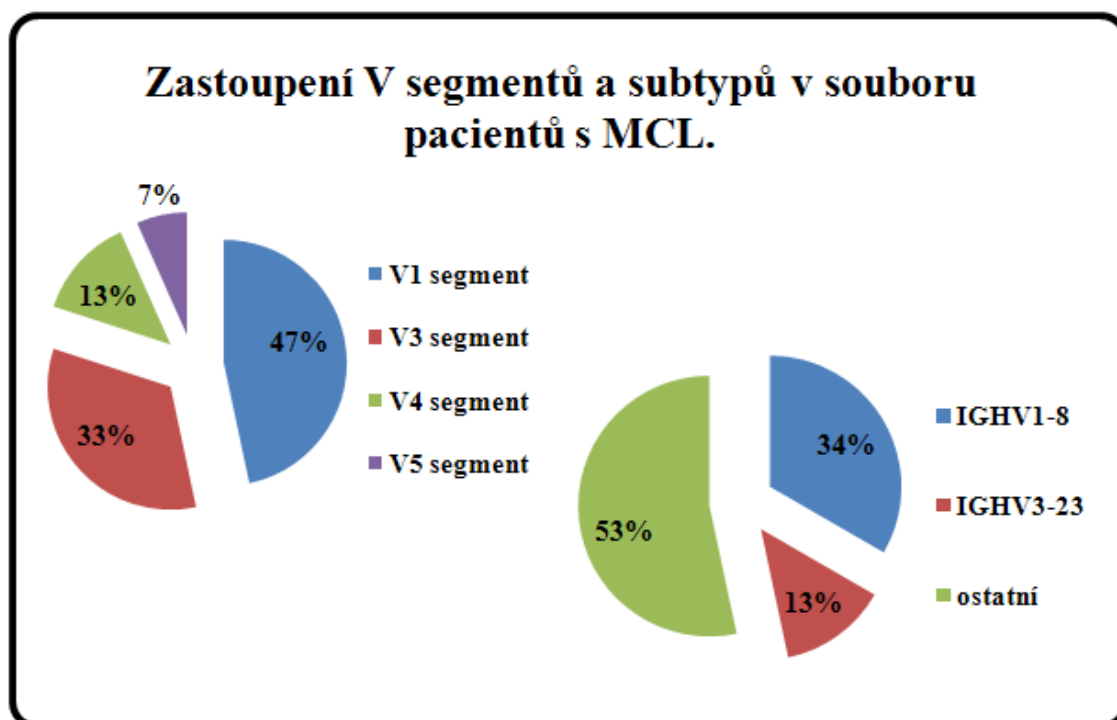


**Graf č. 3 Zastoupení J segmentů v sledovaném souboru pacientů s MCL a FL.**

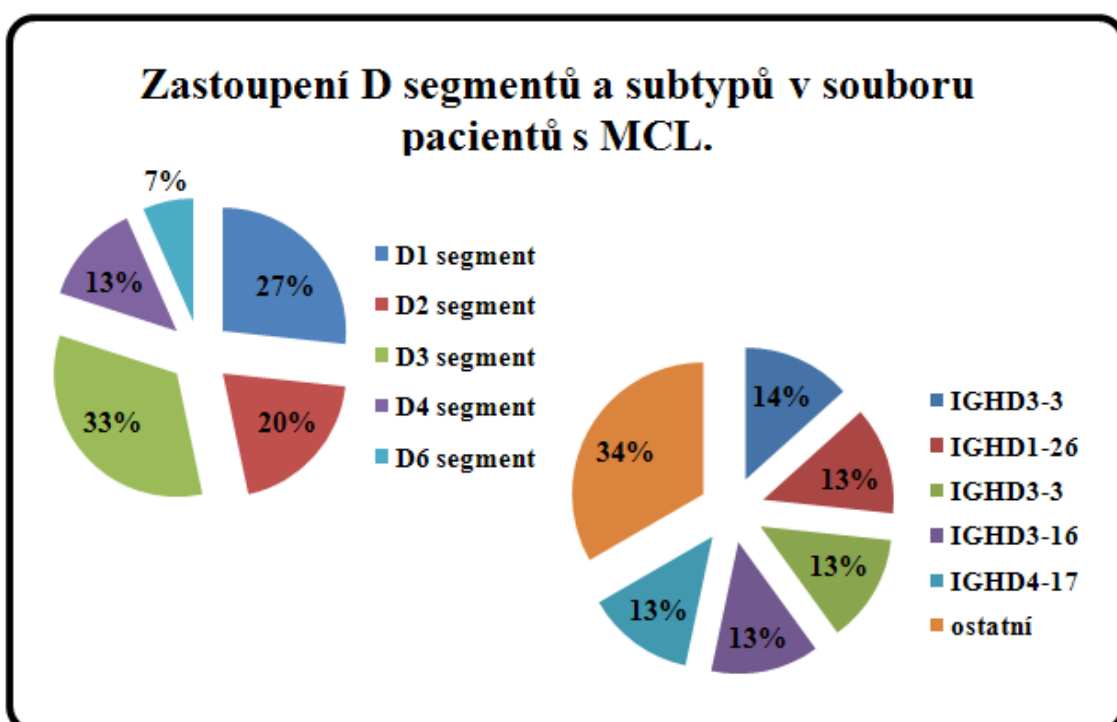
U 15 pacientů pouze s diagnózou MCL byla zjištěna zvýšená četnost výskytu segmentů rodiny V1 a V3. Pacienti č. 1, 5, 8, 11 a 12 sdílejí v klonální přestavbě segment IGHV1-8 (33%) a pacienti č. 7 a 8 sdílejí segment V3-23 (13%). Nejčastějšími D-segmenty byl typ D3 (40%) a z J-segmentů J4 (47%). Data jsou shrnuta v grafech č. 4 a 5.

Dále byla provedena analýza výskytu dvojic některých typů genových segmentů v rámci klonální přestavby. U pacientů č. 1, 5 a 11 byla zjištěna vazba segmentu IGHV1-8 se segmenty IGHD3-10 a IGHD1-26. Co se týče vazby D-segmentů s J-segmenty, tak bylo zjištěno, že pacienti č. 7 a 9, sdílejí segment IGHD3-23 s IGHJ4. Se segmentem IGHJ4 je s vyšší četností ve vazbě také segment IGHV1-8, jak bylo zjištěno u pacientů č. 1, 5 a 11.

U 6 pacientů (MCL) s translokací t(11;14) v oblasti MTC byly analyzovány J-segmenty zavzaté do translokace s genem BCL1. U čtyř pacientů byla zjištěna přítomnost segmentu IGHJ5 a u dvou pacientů segmentu IGHJ6.



Graf č. 4 Zastoupení V segmentů a subtypů v souboru pacientů s MCL.



Graf č. 5 Zastoupení D segmentů a subtypů v souboru pacientů s MCL.

### 5.3. Návrh klonálně specifických primerů

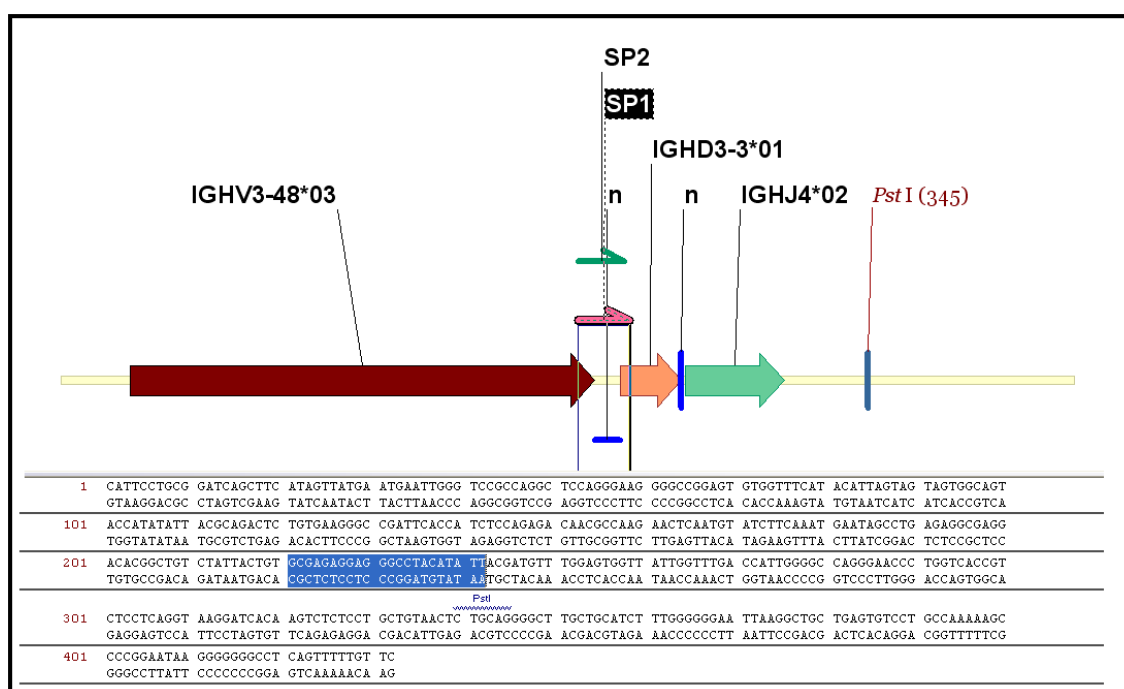
Detekce MRN u lymfoproliferativních onemocnění je založena na amplifikaci specifické sekvence klonálních přestaveb genů pro Ig/TCR či amplifikaci sekvence specifické translokace. Návrh klonálně specifických primerů je složitý a časově a finančně náročný proces, který je ovšem pro detekci MRN klíčový. Vhodně navržené specifické primery umožňují specifickou amplifikaci nádorové DNA a detekci reziduálních nádorových buněk s citlivostí až  $10^{-6}$ .

Byly analyzovány sekvence klonálních přestaveb genů pro IgH u 19 pacientů (15 MCL, 4 FL). Po analýze genových segmentů a jejich přechodových oblastí byly navrženy klonálně specifické primery u 12 z 19 pacientů. U čtyř pacientů se vyskytly problémy ve fázi návrhu klonálně specifických primerů, kvůli kterým bylo nutno vyřadit tyto pacienty ze studie detekce MRN. V tabulce č. 13 je uveden přehled a počty navržených a optimalizovaných klonálně specifických primerů.

<b>Přehled navržených klonálně specifických primerů</b>	
celkem navržených primerů	<b>99</b>
počet primerů použitelných pro detekci MRN	<b>34</b>
průměrný počet primerů na pacienta	<b>4</b>
počet primerů pro amplifikace klonálních přestaveb	<b>85</b>
počet primerů pro amplifikaci translokace t(11;14)	<b>14</b>

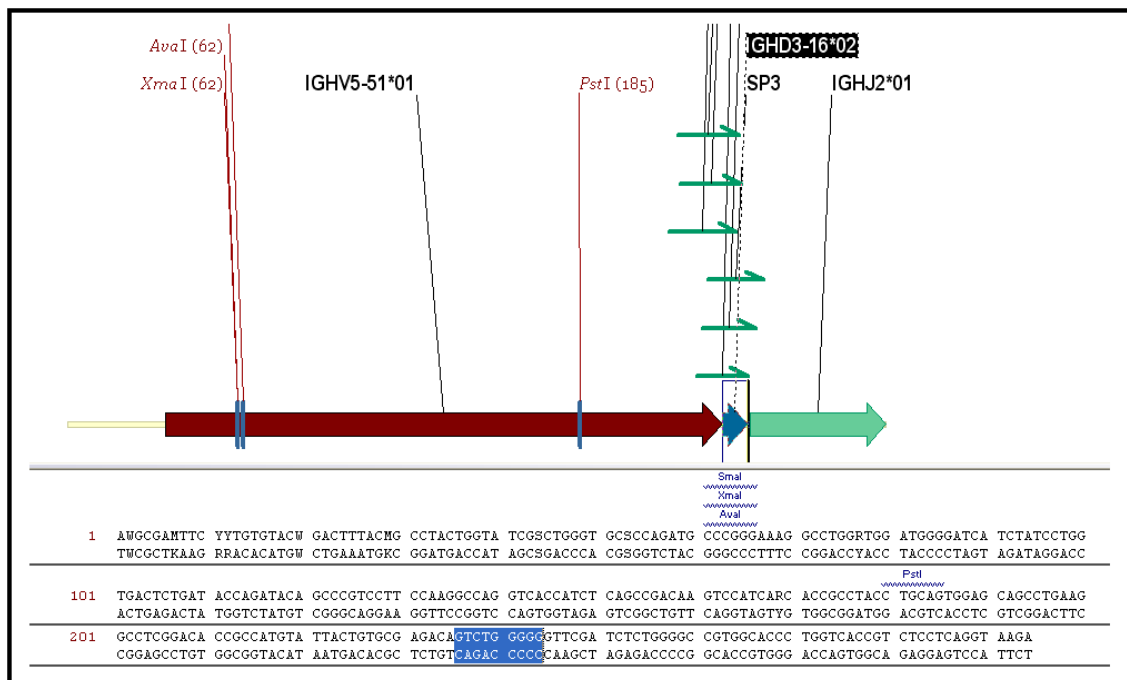
**Tab. č. 13 Přehled a počty navržených klonálně specifických primerů.**

Jedním z klíčových kroků při návrhu klonálně specifických primerů je identifikace a analýza přeskupených segmentů IgH genů. Při analýze cílové sekvence se určuje typ a poloha jednotlivých V, D, J segmentů a také N-úseků, které jsou vloženy mezi segmenty. Největším problémem při návrhu specifických primerů je případná příliš krátká sekvence N-úseků mezi přeskupenými V a J segmenty. Vzdálenosti mezi segmenty, délka vložených N-úseků a celková variabilita přechodových oblastí je specifická pro každou přestavbu. Na obrázcích č. 20 a 21 je znázorněn návrh klonálně specifických primerů. Na obrázku č. 20 je znázorněna klonální Ig přestavba a návrh primerů, který byl úspěšný pro detekci MRN. Na obrázku č. 21 je sekvence pacienta, pro kterého nemohly být navrženy dostatečně specifické primery, které by amplifikovaly pouze nádorovou DNA pacienta.



**Obr. č. 20 Návrh klonálně specifických primerů využitých pro detekci MRN.**

Na obrázku je znázorněna sekvence klonálně specifické přestavby genů pro IgH. Červeně je vyznačen V-segment, oranžově D-segment a zeleně J-segment. Modrou barvou a písmeny „n“ jsou vyznačeny N-úseky. Na obrázku jsou zobrazeny dva ideálně navržené primery SP1 a SP2. Oba začínají ve V-segmentu, pokrývají oblast N-úseku a končí v oblasti D-segmentu.



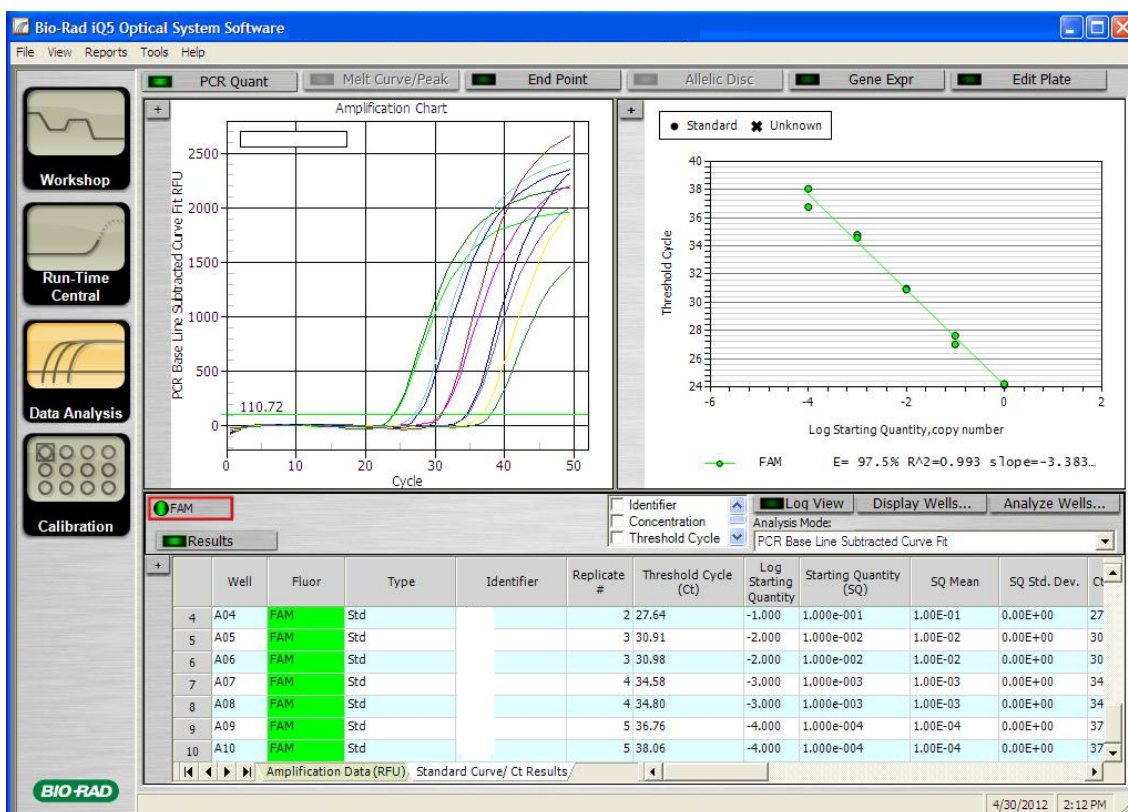
**Obr. č. 21 Návrh klonálně specifických primerů – problematika návrhu.**

Na obrázku je znázorněna sekvence klonálně specifické přestavby genů pro IgH. Červeně je vyznačen V-segment, modře D-segment a zeleně J-segment. Je zde zobrazena sada navržených klonálně specifických primerů. Struktura sekvence neobsahuje žádné N-úseky vložené mezi jednotlivé segmenty.

#### 5.4. Sledování hladiny MRN a optimalizace systému

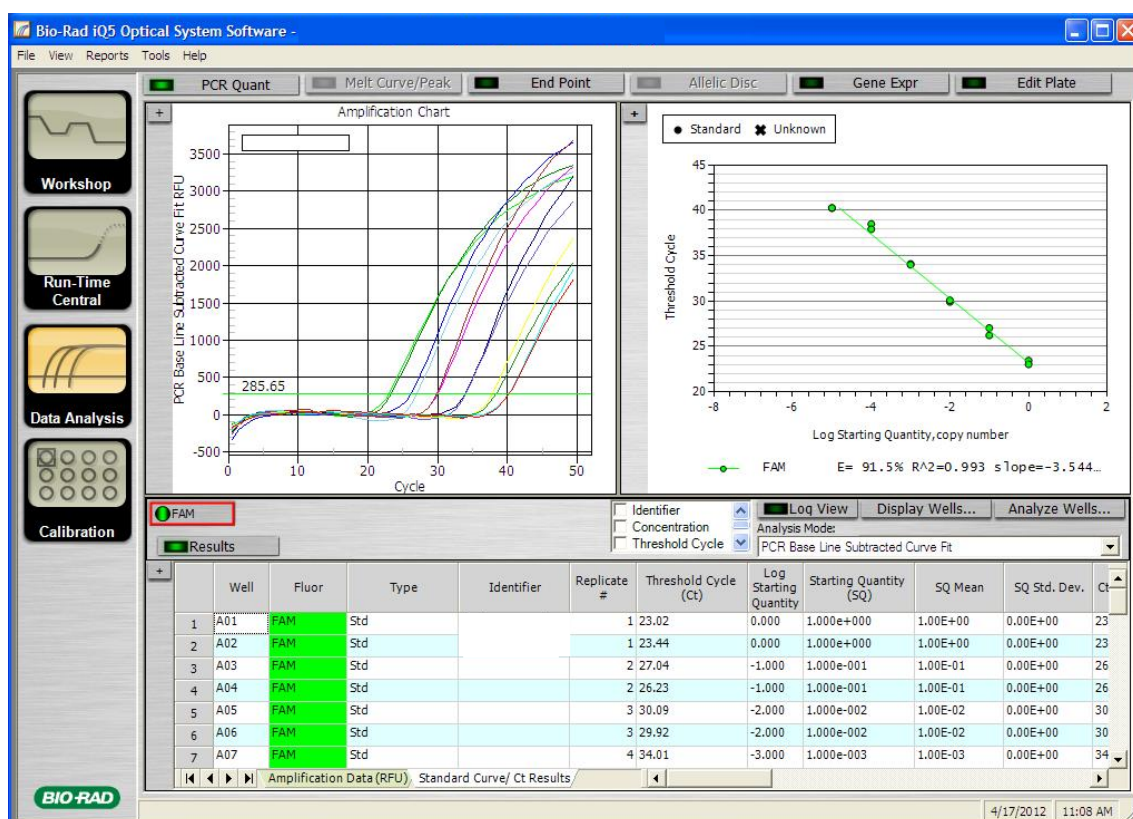
Celkem bylo sledováno 12 pacientů pomocí kvantifikace klonální přestavby genu IgH, u 6 těchto pacientů byla detekována pozitivita na translokaci t(11;14) v oblasti MTC. U 5 pacientů bylo možné sledovat MRN pomocí dvou nezávislých znaků (IgH; t(11;14) v oblasti MTC).

Detekce MRN se provádí po navržení klonálně specifických primerů a po optimalizaci RQ-PCR systému. Na obrázku č. 22 a 23 jsou výstupy z optimalizace RQ-PCR. Jsou zde znázorněny amplifikační křivky, které poskytuje amplifikace s vhodně navrženým a dostatečně specifickým primerem. Je nutné, aby detekční systém při sledování MRN splňoval všechna kritéria ESG-MRD-ALL.



Obr. č. 22 Amplifikační křivky klonálně specifické přestavby genů pro IgH. Výstup z RQ-PCR. QR  $10^{-4}$  a senzitivita (S)  $10^{-4}$ .





Obr. č 23 Amplifikace translokace t(11;14) v oblasti MTC pomocí klonálně specifických primerů. QR  $10^{-4}$  a S  $10^{-5}$ .

U 12 pacientů s MCL bylo analyzováno celkem 37 aspirátů KD pomocí pacient specifické přestavby IgH genů. Z toho 5 pacientů bylo také sledováno pomocí specifické translokace t(11;14) v oblasti MTC. Výsledky normalizovaných hladin MRN jsou shrnuty v tabulce č. 15. Sledování MRN je prezentováno na vybraných pacientech, viz dále.

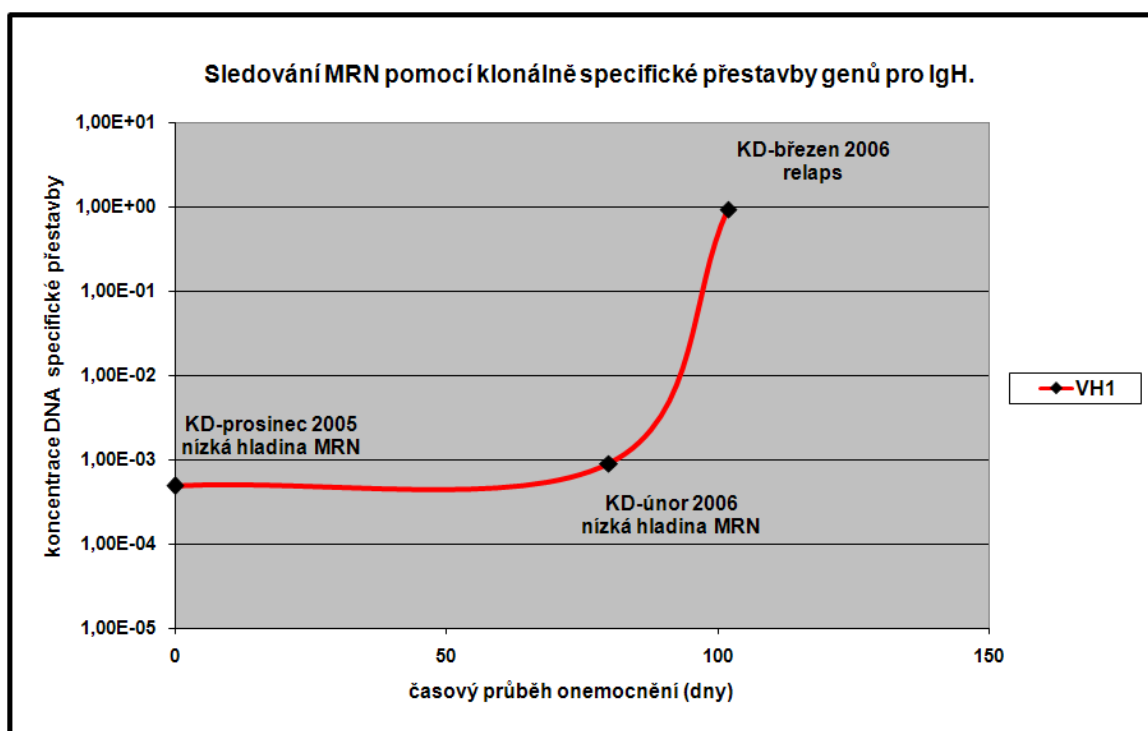
č. p	p	diagnóza	druh tkáně	č. vz.	[IgH/ALB]	[t(11;14) MTC+/ALB]
1	M	MCL	KD	1-2	4,86E-04	
			KD	1-3	8,87E-04	
			KD	1-4	1,10E+00	
2	M	MCL	KD	2-2	2,85E-01	
			KD	2-3	3,23E-03	
			KD	2-4	pozitivní ( $10^{-6}$ )	
			KD	2-5	5,79E-04	
			KD	2-6	7,97E-04	
3	Ž	MCL	KD	3-2	1,01E-01	4,68E-02
			KD	3-3	2,06E-04	7,06E-06
			KD	3-4	2,41E-04	3,43E-05
			KD	3-5	3,65E-04	8,75E-05
4	M	MCL	KD	4-2	6,04E-02	1,83E-01
			KD	4-3	8,07E-04	1,80E-02
			KD	4-4	2,51E-01	1,55E+00
			KD	4-5	negativní ( $10^{-8}$ )	negativní ( $10^{-8}$ )
			KD	4-6	2,05E-04	negativní ( $10^{-8}$ )
5	M	MCL	KD	5-3	3,26E-02	
			KD	5-4	9,89E-03	
6	Ž	MCL	KD	6-2	4,21E-01	
			KD	6-3	1,32E-01	
			KD	6-4	negativní ( $10^{-8}$ )	

7	Ž	MCL	KD	7-2	3,55E-02	
			KD	7-3	pozitivní ( $10^{-6}$ )	
			KD	7-4	2,85E-03	
8	Ž	MCL	KD	8-2	2,21E-02	
9	M	MCL	KD	9-2	4,13E-01	1,68E+00
			KD	9-3	2,11E+00	3,27E+00
			KD	9-4	negativní ( $10^{-8}$ )	negativní ( $10^{-8}$ )
			KD	9-5	9,51E-03	1,96E-01
10	Ž	MCL	KD	10-1	8,10E+00	
			KD	10-2	2,68E-01	
11	Ž	MCL	KD	11-2	pozitivní ( $10^{-6}$ )	negativní ( $10^{-8}$ )
			KD	11-3	pozitivní ( $10^{-6}$ )	negativní ( $10^{-8}$ )
			KD	11-4	negativní ( $10^{-8}$ )	negativní ( $10^{-8}$ )
12	Ž	MCL	KD	19-2	negativní ( $10^{-8}$ )	negativní ( $10^{-8}$ )
			KD	19-3	negativní ( $10^{-8}$ )	negativní ( $10^{-8}$ )

**Tab. č 15 Výsledky kvantifikace klonálních přestaveb IgH genů a translokace t(11;14) v oblasti MTC u pacientů s MCL.**

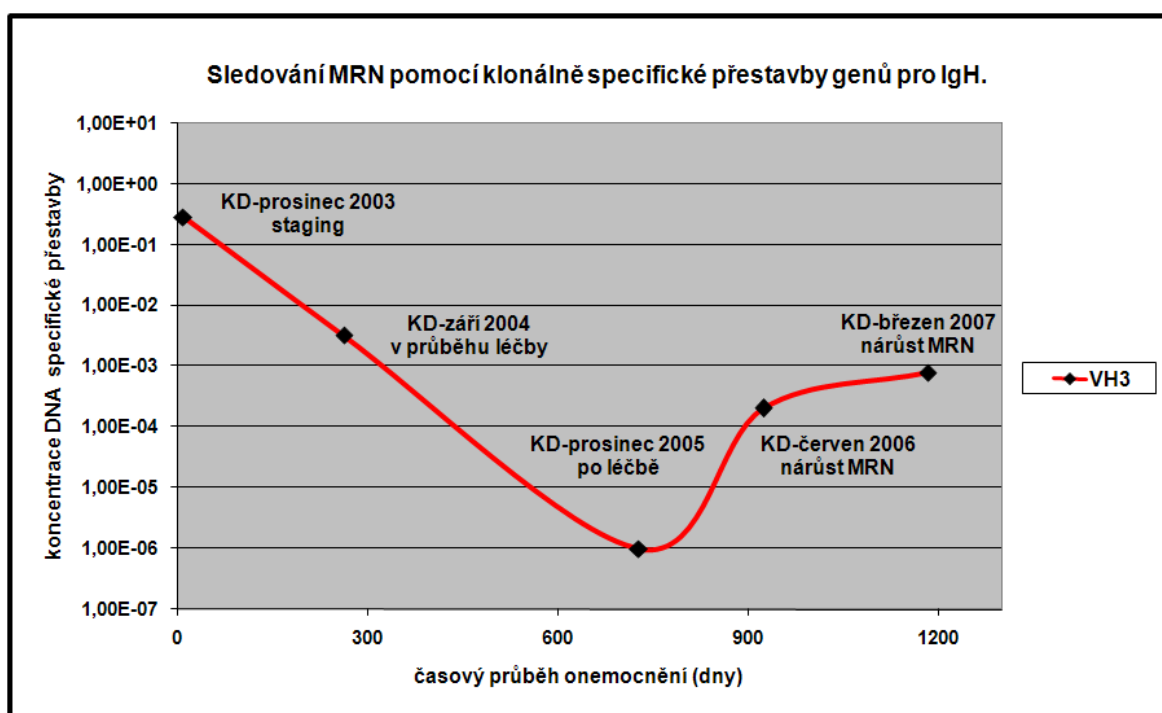
M-muž; Ž-žena; p.-pohlaví; č.p.-číslo pacienta; č.vz.-číslo vzorku; KD- kostní dřeň; ALB-albumin

V diagnostickém vzorku pacienta č. 1 byla prokázána klonalita v genu pro IgH. Byly navrženy dva klonálně specifické primery, které slouží k detekci MRN. Tyto klonálně specifické primery dobře amplifikovaly specifickou DNA a jeden z nich vykazoval QR  $10^{-4}$  a S  $10^{-5}$ . U pacienta byly k dispozici 3 aspiráty KD, které byly odebrány v průběhu čtyř měsíců. Vzorek KD č. 1 byl odebrán v rámci „stagingu“ (odběr před terapií) v prosinci 2005 a byla u něj detekována nízká hladina MRN, stejně jako u vzorku č. 2, který byl odebrán po 2 měsících léčby. Ve vzorku č. 3, odebraného v březnu 2006, byla detekována vysoká hladina reziduální nemoci, která potvrzuje hematologický relaps. Výsledky sledování MRN u pacienta č. 1 jsou zobrazeny v grafu č. 6.



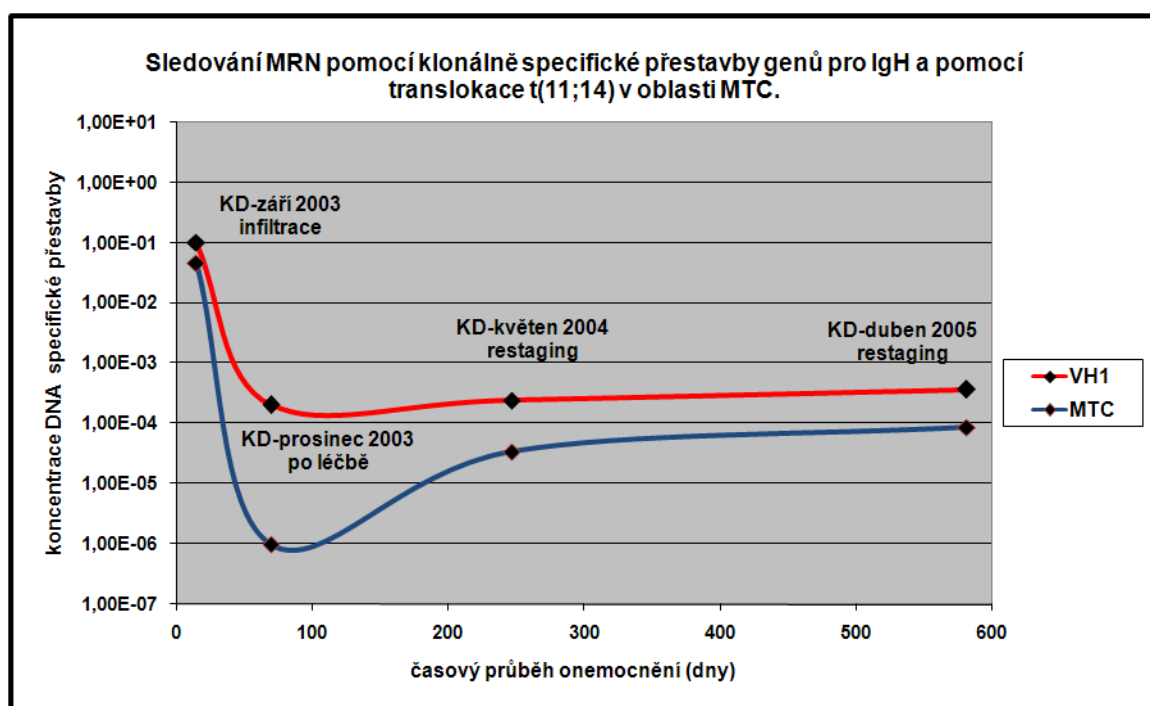
**Graf č. 6 Sledování MRN v aspirátech KD u pacienta s MCL.**

U pacienta č. 2 byly navrženy dva klonálně specifické primery pro kvantifikaci IgH přestavby. Primer SP1 amplifikoval specifickou DNA s QR  $10^{-4}$  a S  $10^{-4}$ . U tohoto pacienta bylo k dispozici 5 aspirátů KD, které byly odebrány v průběhu tří let a čtyř měsíců. Vzorek KD č. 1 byl odebrán v rámci „stagingu“ onemocnění. Tento vzorek byl infiltrovaný nádorovými buňkami. Vzorek č. 2 byl odebrán v průběhu léčby a vzorek č. 3 po ukončení léčby, kdy docházelo k redukci nádorových buněk. U vzorků č. 4 a 5, odebraných v červnu 2006 a březnu 2007, byl detekován nárůst hladiny reziduální nemoci, což svědčí pro molekulární relaps onemocnění. Sledování hladiny MRN u pacienta č. 2 je zobrazeno v grafu č. 7.



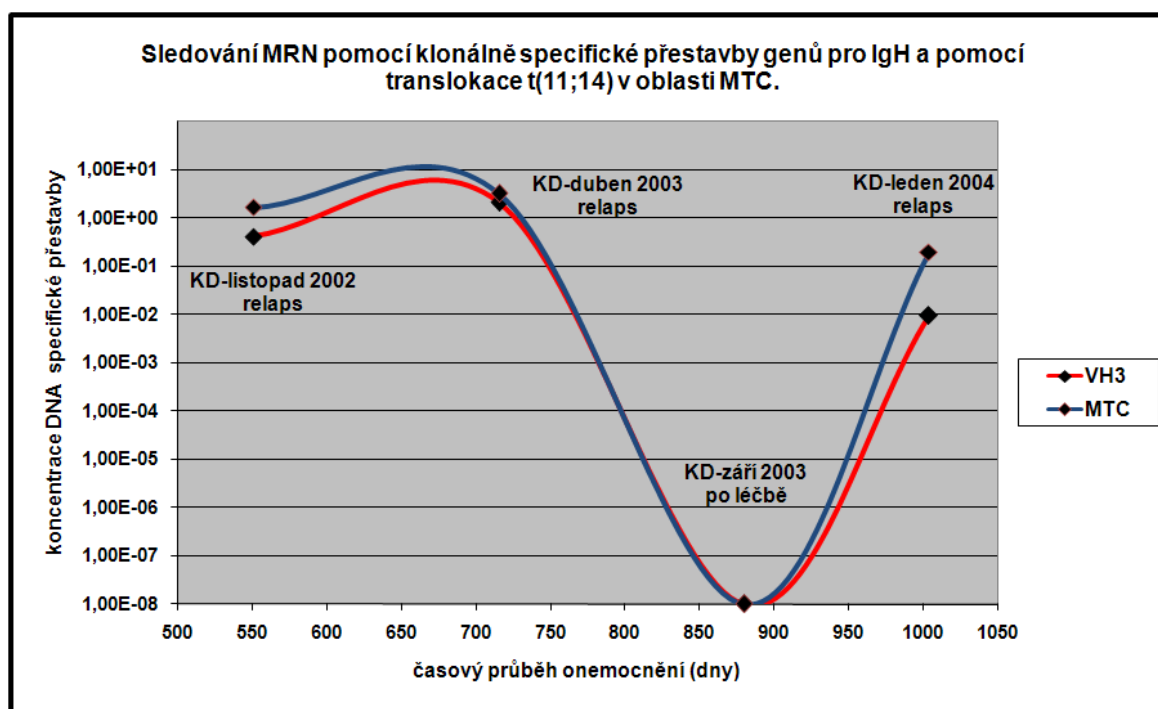
**Graf č. 7 Sledování hladiny MRN v aspirátech KD u pacienta č. 2.**

Pacient č. 3 měl v diagnostickém vzorku detekovánu kromě klonality IgH také traslokaci t(11;14) v oblasti MTC. Pro detekci MRN pomocí specifické klonální přestavby IgH byly navrženy čtyři klonálně specifické primery. Po optimalizaci byl vybrán jeden primer, který vykazoval QR  $10^{-4}$  a S  $10^{-5}$ . Pro amplifikaci sekvence translokace t(11;14) v oblasti MTC byly navrženy dva klonálně specifické primery, lepší z nich amplifikoval sekvenční translokace s QR  $10^{-5}$  a S  $10^{-5}$ . U tohoto pacienta byly k dispozici 4 aspiráty KD, které byly odebrány v období září 2003 až duben 2005 a ve všech KD byla detekována hladina MRN. Vzorek KD č. 1 byl odebrán v rámci „stagingu“ onemocnění v září 2003. Vzorek byl silně infiltrován nádorovými buňkami. Ve vzorku KD č. 2 odebraného v prosinci 2003 došlo k redukci nádorových buněk a snížení hladiny MRN. Vzorky KD č. 3 a 4 byly odebrány v květnu 2004 respektive dubnu 2005 a byly odebrány v rámci „restagingu“ onemocnění. Dynamika hladiny MRN je zobrazena v grafu č. 8.



**Graf č. 8 Detekce MRN pomocí dvou nezávislých molekulárních cílů u pacienta s MCL.**

U pacienta č. 9 byla kromě klonální přestavby v IgH genu detekována také traslokace t(11;14) v oblasti MTC. Pro detekci MRN pomocí specifické klonální přestavby IgH byly navrženy dva specifické primery. Po optimalizaci byl vybrán primer, který vykazoval QR  $10^{-3}$  a S  $10^{-4}$ . Pro amplifikaci sekveny translokace t(11;14) v oblasti MTC byly navrženy tři klonálně specifické primery, použitý primer pro detekci MRN amplifikoval sekveny translokace s QR  $10^{-5}$  a S  $10^{-5}$ . U tohoto pacienta byly k dispozici 4 aspiráty KD, které byly odebrány v období listopad 2002 až leden 2004. Pacient byl sledován až v době relapsu onemocnění, kdy jsme detekovali vysokou hladinu reziduální nemoci ve vzorku KD č. 1, odebrané v listopadu 2002. Další vzorek KD č. 2 byl dostupný až v době 2. relapsu, a byla u něj detekována také vysoká hladina reziduální nemoci. Vzorek KD č. 3 byl odebrán v září 2003 po léčbě relapsu onemocnění a vykazoval negativní MRN v obou systémech. Nicméně u vzorku KD č. 4 je detekována opět vysoká hladina reziduální choroby, která svědčí pro opětovný relaps onemocnění. Dynamika hladiny MRN u pacienta č. 4 je znázorněna v grafu č. 9.



**Graf č. 9 Sledování hladin MRN pomocí dvou nezávislých molekulárních cílů v aspirátech KD u pacienta s MCL.**

## 6. DISKUZE

Molekulární diagnostika je účinný nástroj moderní medicíny pro rozlišení různých lymfoproliferativních onemocnění. Molekulární diagnostika maligních lymfoproliferací využívá v první řadě vyšetření klonality onemocnění, které je založeno na skutečnosti, že všechny nádorové buňky jsou odvozené od původní nádorové buňky a mají tedy stejné znaky. Více než 98% lymfoidních malignit obsahuje klonální přestavby genů pro Ig/TCR a zhruba 25-30% případů lymfomů nese charakteristické chromozomální translokace (van Dongen et al., 2003).

Nutnost správné diagnostiky lymfoproliferativních onemocnění vedla k vytvoření standardizovaného mezinárodního protokolu BIOMED-2, na kterém spolupracovalo 47 institucí zabývajících se diagnostikou lymfoproliferativních onemocnění. Společně vytvořily a standardizovaly multiplex PCR eseje pro detekci klonality přestaveb genů pro IgH (VH-JH; DH-JH), IgK, IgL, TCR ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) a detekci chromozomálních translokací t(11;14) a t(14;18) (van Dongen et al., 2003). Detekce klonality Ig/TCR genů pomocí PCR má svá úskalí a omezení, která mohou zkreslit výslednou interpretaci. Je nutné si uvědomit, že klonalita nádorových buněk může být detekována v rámci normálního polyklonálního pozadí a detekční limit dané screeningové diagnostické metody se tedy pohybuje od 1-15%. Velmi důležité je také zmínit, že přítomnost klonality nemusí vždy znamenat přítomnost malignity. Existují benigní proliferace, jako například benigní monoklonální gammapatie, lymfomatoidní papulóza, CD8 pozitivní T lymfocytóza, které mají klonální původ. Úskalí při detekci klonality může být falešně pozitivní či negativní výsledek. Falešně negativní výsledek může být způsoben somatickými mutacemi ve V-segmentech imunoreceptorů v místech, kde nasedají primery. Je to typické především pro lymfoproliferace odvozené z GC a postGC, u kterých dochází k izotypovému přesmyku. Falešně pozitivní výsledek může vzniknout při špatném rozlišení mezi monoklonálními a polyklonálními PCR produkty. Je proto nutné využívat metodiku, která je schopna rozlišit identické přechodové oblasti monoklonálních buněk od vysoce odlišných přechodových oblastí buněk polyklonálních. Takovou technikou je například heteroduplexní analýza, která je využívána v naší laboratoři. V rámci diagnostiky pacientů s lymfoproliferativními onemocněními byla v naší laboratoři zavedena a optimalizována screeningová metoda detekce klonality Ig/TCR genů dle protokolu BIOMED-2 (van Dongen et al., 2003). Vyloučení falešně negativních a falešně pozitivních výsledků je nutné eliminovat



a přistupovat k diagnostice maligních lymfoproliferací komplexním přístupem a korelovat dostupné diagnostické metodiky, které využíváme i v naší laboratoři. Všichni pacienti jsou nejprve vyšetřeni pomocí klasické morfologické a imunohistochemické diagnostiky, kdy následně dochází k vyšetření specializovanými metodami jako je průtoková cytometrie, „in situ fluorescenční hybridizace“ na interfázních jádrech a molekulární metody detekce klonality imunoreceptorových genů a chromozomálních translokací, případně vyšetření atypických expresí genů.

U pacientů zahrnutých do této studie byla provedena molekulární diagnostika daného onemocnění. Po izolaci DNA z biotických vzorků bylo třeba ověřit její kvalitu a integritu pomocí amplifikace kontrolních genů CTRL. V případě vzorků zmražené tkáně nedochází k degradaci DNA, a proto jsou tyto vzorky preferovány pro diagnostiku. Nicméně někdy je nutno izolovat DNA z tkáně, která je fixována ve formolu a zalita do parafínu. DNA izolovaná z těchto vzorků bývá degradována díky dlouhé fixaci v kyselém formolu a následná práce s takovou DNA je obtížná. Mnohem šetrnější postup, co se týče integrity DNA, je fixace tkáně v ethanolu, který nezpůsobuje degradaci DNA jako formol. Právě kvalita DNA je jedním z problémů, které omezují jak diagnózu, tak i detekci MRN. Pokud je k dispozici pouze diagnostický vzorek z tkáně fixované ve formolu a DNA takového vzorku je špatné kvality (degradována/nízká koncentrace), pak je velmi obtížná nejen diagnostika, ale také vytvoření ředící řady pro RQ-PCR systém.

Klonalita přestaveb genů pro IgH byla detekována u 19 pacientů s MCL a FL. U 6 z 15 (40%) pacientů s MCL byla detekována také translokace t(11;14) v oblasti MTC. Naše výsledky jsou v souladu s pracemi, ve kterých je uváděna 30-50% četnost výskytu t(11;14) v oblasti MTC u MCL (van Dongen et al., 2003; Jares, Campo, 2008). Všechny klonální přestavby a translokace t(11;14) byly využity k sekvenační analýze. Sekvenační analýza klonálních přestaveb genů pro Ig, respektive sekvence translokace t(11;14), umožňuje identifikovat a analyzovat jednotlivé přeskupené V(D)J segmenty, N-úseky, respektive translokovaný gen BCL1 s J-segmentem.

U 15 pacientů s MCL byly analyzovány VDJ přestavby genu pro IgH. Nejčastěji se vyskytovaly segmenty z rodin IGHV1 a IGHV3. Z D-segmentů se v přestavbách nejčastěji vyskytovala rodina IGHD3 a u J-segmentů rodina IGHJ4. Nejčastějším subtypem V-segmentů byl IGHV1-8, který v klonální přestavbě sdíleli 4 pacienti. Dalším nejvíce zastoupeným subtypem byl IGHV3-23, který byl nalezen u 2 pacientů.

Dále byly analyzovány jednotlivé segmenty v rámci přestaveb a ukázalo se, že některé V, D, J segmenty spolu párují častěji. U 2 pacientů pároval segment IGH1-8 se segmentem IGHD1-26 a u 1 pacienta se segmentem IGHD3-10. U 2 pacientů bylo nalezeno párování segmentů IGHD3-23 a IGHJ4. Se segmentem IGHJ4 páruje segment IGHV1-8, jak bylo zjištěno u 3 pacientů. Výsledky získané na našem malém souboru 15 pacientů s MCL byly porovnány s výsledky, které získala Hadzidimitriou et al. (2011), kde bylo analyzováno 807 produktivních VDJ přestaveb genu pro IGH u MCL. Hlavní zastoupení mezi V-segmenty měly především segmenty z rodin IGHV3 a IGHV4, v našem souboru se jednalo o segmenty IGHV1 a IGHV3. Nejčastěji se vyskytující subtypy V-segmentů byly IGHV3-21, IGHV4-34, IGHV1-8 a IGHV3-23, kdy v porovnání subtypů, byly IGHV1-8 a IGHV3-23 častěji zastoupeny také v našem souboru pacientů. Mezi D-segmenty měly největší zastoupení IGHD3 a IGHD6 a z J-segmentů to byly IGHJ4 a IGHJ6. Tyto výsledky korelují s našimi daty, kdy byly v přestavbách nejčastěji zastoupeny segmenty IGHD3 a IGHJ4. Zároveň studie porovnává četnost výskytu daných segmentů v rámci jedné přestavby. Bylo zjištěno, že segment IGHV3-21 se nejčastěji vyskytuje v páru se segmentem IGHD3-3, obdobně IGHV1-8 rekombinuje s IGHD3-10 a IGHV4-34 s IGHD2-2 nebo IGHD2-15. V našem malém souboru bylo nalezeno také párování segmentů IGHV1-8 – IGHD3-10 a IGHV4-34 – IGHD2-2, jednalo se však pouze o jednotlivá zastoupení. Také byly analyzovány nejčastější asociace V a J-segmentů v rámci klonální přestavby. IGHV3-21 se vyskytuje nejčastěji s IGHJ6 zatímco IGHV3-23 s IGHJ4. Vazba mezi segmenty IGHV3-23 a IGHJ4 byla potvrzena také v naší studii. Je samozřejmě nutné přihlédnout k faktu, že v našem případě se jedná o malý soubor pacientů, nicméně i na těchto datech je patrné, že analýza segmentů koreluje s výsledky práce Hadzidimitriou et al. (2011).

U 12 pacientů s MCL byly na základě získané sekvence navrženy klonálně specifické primery pro detekci MRN. Pro 5 pacientů z tohoto souboru byly navrženy také specifické primery pro amplifikaci translokace t(11;14) v oblasti MTC. V případě čtyř pacientů se vyskytl klíčový problém v nemožnosti navrhnout dostatečně specifické primery, které by umožnily detekci MRN. Tento problém bývá spojen s příliš krátkými přechodovými sekvencemi a N-úseky, které jsou vloženy mezi jednotlivé V, D, J segmenty. Poté se při optimalizaci systému stává, že primery, které příliš přesahují do genových segmentů, amplifikují i DNA z nenádorových buněk a takový primer nesplňuje kritéria ESG-MRD-ALL. Vždy je nutné optimalizovat RQ-PCR systém pro

daný specifický primer. Často je nutné návrh primerů opakovat a někdy se stává, že systém přestavby návrh primerů ani neumožní. Návrh klonálně specifických primerů má zásadní vliv na citlivost RQ-PCR systému a z těchto důvodů byla vytvořena kritéria ESG-MRD-ALL. Velkým problémem v případě genů pro imunoreceptory je pozadí zdravých lymfocytů, což platí zvláště pro systémy s menším množstvím rekombinovatelných genových segmentů, a tedy s menším počtem pravděpodobně vzniklých kombinací. Jedná se tedy zejména o TCR $\gamma$ , TCR $\delta$  a Igk (Froňková, Trka, 2005). Aby se v co největší míře zabránilo možnosti vzniku falešně pozitivního výsledku, používá se jako negativní kontrola DNA z BC smíchaná od co největšího počtu zdravých dárců (minimální doporučený počet je 5, většina laboratoří používá 10), a to podle doporučení nejméně v šesti replikátech do reakce (van der Velden et al., 2007).

V souboru 12 pacientů s MCL byla sledována MRN pomocí kvantifikace přestaveb genu pro IgH. U 5 z 12 (42%) pacientů byly k dispozici dva molekulární cíle pro detekci hladiny MRN. Výsledky hladin MRN získané pomocí kvantifikace dvou cílů byly porovnány a byla mezi nimi zjištěna korelace (korelační koeficient 0,984). Při porovnání hladin MRN získaných pomocí kvantifikace dvou nezávislých cílů jsou patrné odchylky u některých vzorků. Jde zřejmě o odlišnou citlivost systému, kterou definují navržené primery. Při sledování MRN je nutné klást důraz na správný výběr molekulárních cílů. Práce Szczepański et al., 2002 poukazuje na význam sledování MRN pomocí alespoň dvou cílů u ALL. U některých lymfoproliferativních onemocnění jako je ALL, dochází k sekundární V(D)J rekombinaci, což může způsobit ztrátu cíle pro detekci MRN. Byly prokázány velké rozdíly ve stabilitě monoklonálních a oligoklonálních přestaveb genů pro IgH, IgK, TCR  $\delta$  při relapsu onemocnění. V 10 případech (22%) došlo ke ztrátě cíle pro detekci MRN při relapsu onemocnění. Zdá se, že u MCL postačuje ke sledování MRN pouze jeden molekulární cíl. Množství somatických mutací je nižší než u ostatní lymfoproliferací a proto se nepředpokládá, že by došlo ke ztrátě cíle pro sledování MRN. Na druhou stranu byly publikovány studie, které tvrdí, že MCL obsahuje nejen buňky odvozené z pre-GC, u kterých nedochází k somatickým mutacím IgH genů, ale také buňky, které přišly do styku s antigenem, a u kterých byly aktivovány sekundární mutace v IgH genech (Camacho et al., 2003; Agathangelidis et al., 2011).

Již v pracích Brüggemann et al., 2004; Pott et al., 2006; Pott et al., 2010 bylo prokázáno, že klonální přestavby genů pro IgH a translokace t(11;14) v oblasti MTC, jsou vhodné cíle pro sledování MRN u pacientů s MCL. V těchto studiích byl prokázán prognostický faktor sledování MRN pro hodnocení průběhu léčby. Významné je především sledování MRN u pacientů, kteří podstoupí autologní transplantaci kmenových buněk (ASCT). V práci Pott et al., 2006 byla sledována MRN u 29 pacientů, kteří byli léčeni vysokodávkovou radiochemoterapií a podstoupili ASCT. U 14 z 29 pacientů se podařilo dosáhnout kompletní klinické i molekulární remise. U 13 z 29 pacientů byla detekována MRN v prvním roce po ASCT. Bylo prokázáno, že sledování MRN po ASCT je významný ukazatel pro léčbu MCL a definuje podskupiny pacientů s výrazně odlišnou prognózou. Sledování MRN umožňuje porovnání relativního dopadu různých léčebných postupů (konvenční chemoterapie, autologní transplantace kmenových buněk, použití monoklonálních protilátek) na určité množství nádorových buněk a studovat kinetiku úbytku či opětovného nárůstu nádoru (Pott et al., 2006).

V našem souboru 12 pacientů, u kterých byla sledována hladina MRN, byl u 3 pacientů diagnostikován relaps onemocnění a ve všech těchto případech došlo k nárůstu hladiny reziduální nemoci. Z toho lze usuzovat, že sledování MRN může sloužit jako prognostický faktor pro predikci relapsu onemocnění. U pacientů, kteří se nacházejí v hematologické remisi, nebyla detekována MRN a nebo byla detekována pouze velmi nízká hladina MRN. U pacientů s 1 či 2 reziduálními vzorky byla provedena detekce MRN, nicméně nedostatek dalších reziduálních vzorků zatím znemožňuje sledovat dynamiku onemocnění a nelze se tedy vyjádřit k predikci stavu onemocnění dle daných hladin MRN. Jedním z hlavních problémů při sledování MRN u našeho souboru pacientů je, že nejsou přesně definovány odběry aspirátů KD během léčby. Nicméně tato retrospektivní studie slouží především k zavedení a optimalizaci detekčního systému a ke zdůraznění významu sledování MRN u pacientů s maligními lymfomy. V současné době již v naší laboratoři běží prospektivní studie u pacientů s MCL, která má přesně definovány odběry reziduálních vzorků dle léčebných protokolů k detekci MRN. Je velmi zásadní, aby vznikaly přesně definované protokoly, podle kterých budou odebírány a zpracovávány reziduální vzorky pro detekci MRN. U některých lymfoproliferativních onemocnění jako je např. ALL jsou již tyto

protokoly zavedeny, nicméně u maligních lymfomů se tyto postupy v rámci výzkumu zavádějí.

MRN u pacientů s MCL je možné sledovat nejen na DNA úrovni pomocí klonálních přestaveb Ig/TCR, respektive chromozomálních translokací, ale také na RNA úrovni pomocí kvantifikace cyklinu D1, který je specificky exprimován téměř ve 100% MCL. V práci Břízová et al., 2008 je pro sledování MRN u pacientů s MCL využita kvantifikace cyklinu D1. V této studii byla prokázána zvýšená hladina cyklinu D1 u infiltrovaných KD, obdobně jako zvýšená hladina MRN zjištěné pomocí klonálních přestaveb Ig genů. Výsledky této studie prokazují, že detekce cyklinu D1 může sloužit k detekci MRN, sledování dynamiky onemocnění a možné predikci relapsu onemocnění.

Naše studie poukazuje na význam sledování MRN u maligních lymfomů a získané výsledky dokazují, že detekce hladin MRN umožňuje sledovat dynamiku onemocnění a zřejmě také predikovat blížící se relaps onemocnění. Dalším krokem bude porovnání našich výsledků detekce hladin MRN pomocí Ig/MTC s expresní studií detekce cyklinu D1 u pacientů s MCL (Břízová et al., 2008).

## 7. SOUHRN

V posledních letech se čím dál více hovoří o významu sledování MRN u lymfoproliferativních onemocnění. Zatímco u některých typů leukémií je detekce MRN již součástí léčebných protokolů, tak sledování MRN u maligních lymfomů je stále pouze ve fázi výzkumu. Sledování MRN je účinný nástroj molekulární medicíny a v budoucnu se jistě stane běžnou součástí léčebných protokolů většiny lymfoproliferativních onemocnění.

Cílem diplomové práce bylo sledování hladiny MRN pomocí pacient specifického RQ-PCR systému u pacientů s maligními lymfomy. Dílčími kroky byla diagnostika lymfoproliferativních onemocnění pomocí detekce a analýzy klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny, respektive translokace t(11;14) v oblasti MTC. Analýza molekulárních cílů umožnila návrh klonálně specifických primerů, které jsou nezbytné pro detekci MRN pomocí RQ-PCR systému.

U 19 pacientů byl diagnostikován v 15 případech MCL a ve 4 případech FL. Translokace t(11;14) v oblasti MTC byla detekována u 6 (40%) pacientů s MCL. U 12 z 19 (63%) pacientů byla sledována MRN. U 5 z 12 (42%) pacientů bylo možné sledovat hladinu MRN pomocí dvou nezávislých molekulárních znaků. Všichni pacienti s nízkou hladinou MRN, respektive nedetekovatelnou hladinou MRN se nacházeli v hematologické remisi. U 3 z 12 (25%) pacientů byl diagnostikován relaps onemocnění a ve všech těchto případech došlo k nárůstu hladiny reziduální nemoci.

Z našich výsledků je patrné, že detekce klonality přestaveb Ig genů popřípadě translokace t(11;14) v oblasti MTC je zlatým standardem v diagnostice maligních lymfomů. Zároveň jsme prokázali korelaci mezi sledováním hladin MRN pomocí dvou nezávislých molekulárních cílů. Tato práce poukazuje na význam detekce hladin MRN pro sledování dynamiky onemocnění u pacientů s MCL. Z našich výsledků tedy vyplývá, že relaps onemocnění je spojen se zvýšením hladiny MRN a že klonální přestavby genů pro Ig jsou vhodným cílem pro sledování MRN u pacientů s maligními lymfomy.

## 8. SEZNAM LITERATURY

Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J. a kol. (2008): Hematologie - Přehled maligních hematologických nemocí - 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Grada Publishing, Praha, 106, 137.

Adami, J., Gabel, H., Lindelof, B., Ekstrom, K., Rydh, B., Glimelius, B., Ekbom, A., Adami, H.O., Granath, F. (2003): Cancer risk following organ transplantation: a nationwide cohort study in Sweden. *Br J Cancer* 89: 1221–1227.

Agathangelidis, A., Hadzidimitriou, A., Rosenquist, R., Stamatopoulos, K. (2011): Unlocking the secrets of immunoglobulin receptors in mantle cell lymphoma: implications for the origin and selection of the malignant cells. *Semin Cancer Biol.* 21(5):299-307.

Beà, S., Salaverria, I., Armengol, L., Pinyol, M., Fernández, V., Hartmann, E.M., Jares, P., Amador, V., Hernández, L., Navarro, A., Ott, G., Rosenwald, A., Estivill, X., Campo, E. (2009): Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution wholegenome profiling. *Blood* 113(13): 3059- 3069.

Benson, M. J., Erickson, L.D., Gleeson, M.W., Noelle, R.J. (2007): Affinity of antigen encounter and other early B-cell signals determine B-cell fate. *Curr Opin Immunol.* 19: 275-280.

Borst, J., Brouns, G.S., de Vries, E., Verschuren, M.C., Mason, D.Y., van Dongen, J.J. (1993): Antigen receptors on T and B lymphocytes: parallels in organization and function. *Immunol Rev.* 132:49-84.

Brizova, H., Kalinova, M., Krskova, L., Mrhalova, M., Kodet, R. (2008): Quantitative monitoring of cyclin D1 expression: a molecular marker for minimal residual disease monitoring and a predictor of the disease outcome in patients with mantle cell lymphoma. *Int J Cancer.* 123(12): 2865-70.

Brüggemann, M., Gökbuget, N., Kneba, M. (2012): Acute lymphoblastic leukemia: monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. *Semin Oncol.* 39(1):47-57.

Brüggemann, M., Pott, C., Ritgen, M., Kneba, M. (2004): Significance of minimal residual disease in lymphoid malignancies. *Acta Haematol.* 112(1-2):111-9.

Burger, J.A., Ford, R.J. (2011): The microenvironment in mantle cell lymphoma: cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. *Semin Cancer Biol.* 21(5): 308-12.

Camacho, E., Hernandez, L., Hernandez, S., Tort, F., Bellosillo, B., Bea, S., Bosch, F., Montserrat, E., Cardesa, A., Fernández, P.L., Campo E. (2002): ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 99(1): 238–44.

Camacho, F.I., Algara, P., Rodriguez, A., Ruiz-Ballesteros, E., Mollejo, M., Martinez, N., Martinez-Climent, J.A., Gonzalez, M., Mateo, M., Caleo, A., Sanchez-Beato, M., Menarguez, J., Garcia-Conde, J., Sole, F., Campo, E. & Piris, M.A. (2003): Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood*, 101, 4042–4046.

Campana, D., Coustan-Smith, E. (1999): Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*. 38(4):139-52.

Campana, D., Pui, C.H., (1995): Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance, *Blood*, 85(6): 1416-34

Cohen, P.I., Kurtin, P.J., Donovan, K.A., Hanson, C.A. (1998): Bone marrow and peripheral blood involvement in mantle cell lymphoma. *British Journal of Haematology* 101: 302-310.

Coornaert, B., Baens, M., Heyninck, K., Bekaert, T., Haegman, M., Staal, J., Sun, L., Chen, Z.J., Marynen, P., Beyaert, R. (2008): T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat. Immunol.* 9: 263–271.

Coornaert, B., Carpentier, I., Beyaert, R. (2009): A20: central gatekeeper in inflammation and immunity. *J. Biol. Chem.* 284: 8217– 8221.

Croce, C.M., Shander, M., Martinis, J., Cicurel, L., D'Ancona, G.G., Dolby, T.W., Koprowski, H. (1979): Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:3416–9.



Crotty, S., Johnston, R.J., Schoenberger, S.P. (2010): Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nature Immunology* 11: 114–120.

Dal Col, J., Zancai, P., Terrin, L., Guidoboni, M., Ponzoni, M., Pavan, A., Spina, M., Bergamin, S., Rizzo, S., Tirelli, U., De Rossi, A., Doglioni, C., Dolcetti, R. (2008): Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood* 111:5142–51.

Dalla-Favera, R., Gaidano, G. (2001): Molecular biology of lymphomas. In: DeVita, V.T.J., Hellman, S., Rosenberg, S.A. *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia, Lippincott Williams, and Wilkins 2215–35.

Desiderio, S.V., Yancopoulos, G.D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M.A., Landau, N., Alt, F.W., Baltimore D. (1984): Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature*. 311:752-5.

Du, M.Q. (2011): MALT lymphoma: many roads lead to nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Histopathology* 58: 26-38.

Duggan, M.J., Weisenburger, D.D., Ye, Y.L., Bast, M.A., Pierson, J.L., Linder, J., Armitage, J.O. (1990): Mantle zone lymphoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Cancer* 66: 522–9.

Espeli, M., Mancini, S. J., Breton, C., Poirier, F., Schiff, C. (2009): Impaired B-cell development at the pre-BII-cell stage in galectin-1-deficient mice due to inefficient preBII/stromal cell interactions. *Blood* 113(23): 5878-5886.

Froňková E., Trka J. (2005) Detekce minimální reziduální nemoci u akutních lymfoblastických leukemií pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory: jak se vyhnout špatné interpretaci výsledků. *Transfuze a Hematol. dnes* 11(3):110-115.

Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J., Schatz, D.G. (2000): The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* 18:495–527.

Gellert, M. (2002): V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 71:101–32.

Georgescu, A., Stoicea, M., Comănescu, M., Dobrea, C., Andrei, F., Neagu, M., Cionca, F., Ciobanu, A., Lupu, A., Ardeleanu, C. (2010): Prognostic and predictive significance of the bcl-2/IgH translocation in malignant follicular lymphomas. *Rom J Morphol Embryol*. 51(4): 687-91.

Goulden, N.J., Knechtli, C.J., Garland, R.J., Langlands, K., Hancock, J.P., Potter, M.N., Steward, C.G., Oakhill, A. (1998): Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 100(1): p. 235-44.

Greiner, T.C., Dasgupta, C., Ho, V.V., Weisenburger, D.D., Smith, L.M., Lynch, J.C., Vose, J.M., Fu, K., Armitage, J.O., Brazier, R.M., Campo, E., Delabie, J., Gascoyne, R.D., Jaffe, E.S., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Im, M.Y., Karaman, M.W., Pike, B.L., Chan, W.C., Hacia, J.G. (2006): Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *PNAS* 103: 2352–7.

Gutterman, J.U., Mavligit, G., Burgess, M.A., McCredie, K.B., Hunter, C., Freireich, E.J., Hersh, E.M. (1974): Immunodiagnosis of acute leukemia: detection of residual disease. *J Natl Cancer Inst*. 53(2): 389-92.

Hadzidimitriou, A., Agathangelidis, A., Darzentas, N., Murray, F., Delfau-Larue, M.H., Pedersen, L.B., Lopez, A.N., Dagklis, A., Rombout, P., Beldjord, K., Kolstad, A., Dreyling, M.H., Anagnostopoulos, A., Tsaftaris, A., Mavragani-Tsipidou, P., Rosenwald, A., Ponzoni, M., Groenen, P., Ghia, P., Sander, B., Papadaki, T., Campo, E., Geisler, C., Rosenquist, R., Davi, F., Pott, C., Stamatopoulos, K. (2011): Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood*. 118:3088-95.

Hahn, W.C., Weinberg, R.A. (2002): Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*. 347(20): 1593-603.

Harbour, J.W., Dean, D.C. (2000): The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*. 14: 2393–409.

Harris, N.L., Stein, H., Coupland, S.E., Hummel, M., Favera, R.D., Pasqualucci, L., Chan, W.C. (2001): New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 194–220.

Helmink, B.A., Sleckman, B.P. (2011): The Response to and Repair of RAG-Mediated DNA Double-Strand Breaks. *Annu. Rev. Immunol.* 30:175–202.

Hewitt, S.L., Chaumeil, J., Skok, J.A. (2010): Chromosome dynamics and the regulation of V(D)J recombination. *Immunol Rev.* 237:43-54.

Hoover, R.N. (1992): Lymphoma risks in populations with altered immunity-a search for mechanism. *Cancer Research* 52: 5477–5478.

Hosokawa, Y., Suzuki, H., Suzuki, Y., Takahashi, R., Seto, M. (2004): Antiapoptotic function of apoptosis inhibitor 2-MALT1 fusion protein involved in t(11;18)(q21;q21) mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Res.* 64: 3452–3457.

Chaudhuri, J., Alt, F.W. (2004): Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol.* 4(7):541-52.

Jaeger, U., Kainz, B. (2003): Monitoring minimal residual disease in AML: the right time for real time. *Ann Hematol* 82:139– 47.

Janeway, Ch.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (2001): Immunobiology, 5th edition - The Immune System in Health and Disease. Garland Science. New York.

Jares, P., Campo, E. (2008): Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 142:149-65.

Jares, P., Colomer, D., Campo, E. (2007): Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 7(10):750-762.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M.J. (2008): Cancer Statistic, 2008. *C.A. Cancer J. Clin.* 58: 71–96.

Klapproth, K. T. (2010): Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis, *Br. J. Haematol.* 149: 484–497.

Knudson, A. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 (4): 820–823.

Kolář, Z. a kolektiv (2003). *Molekulární patologie nádorů* (1.vydání). Epava, Olomouc, 130-134.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., Reed, J.C. (1993): Investigation of the sub-cellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53: 4701–14.

Kurtova, A.V., Tamayo, A.T., Ford, R.J., Burger, J.A. (2009): Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood* 113: 4604–13.

Lieber, M.R. (1992): The mechanism of V(D)J recombination: a balance of diversity, specificity, and stability. *Cell* 70:873-876.

Lucas, P.C., Kuffa, P., Gu, S., Kohrt, D., Kim, D.S., Siu, K., Jin, X., Swenson, J., McAllister-Lucas, L.M. (2007): A dual role for the API2 moiety in API2-MALT1-dependent NF-kappaB activation: heterotypic oligomerization and TRAF2 recruitment. *Oncogene* 26: 5643– 5654.

Lucas, P.C., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, L.M., Abazeed, M.E., Chen, F.F., Yamaoka, S., Seto, M., Nunez, G. (2001): Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 19012–19019.

McBride, O.W., Hieter, P.A., Hollis, G.F., Swan, D., Otey, M.C., Leder, P. (1982): Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes. *J Exp Med* 155:1480–90.

Müller, A.M., Ihorst, G., Mertelsmann, R., Engelhardt, M. (2005): Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol.* 84(1):1-12.

Nordling, C. (1953): A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer* 7 (1): 68–72.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.H., Dong, C. (2009): Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325: 1001–1005.

Obrador-Hevia, A., Fernández de Mattos, S., Villalonga, P., Rodríguez, J. (2009): Molecular biology of mantle cell lymphoma: from profiling studies to new therapeutic strategies. *Blood Rev.* 23(5):205-16.

Papajík, T., Trněný, M., Vášová, I., Belada, D., Jankovská, M., Jindra, P., Pavlík, T., Dušek, L., Indrák, K. (2009): Epidemiologie ne-hodgkinových lymfomů v České republice, Evropě a Severní Americe. *Onkologie* 3: 141-146

Pérez-Galán, P., Dreyling, M., Wiestner, A. (2011): Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 117(1):26-38.

Pighi, C., Gu, T.L., Dalai, I., Barbi, S., Parolini, C., Bertolaso, A., Pedron, S., Parisi, A., Ren, J., Cecconi, D., Chilosì, M., Menestrina, F., Zamò, A. (2011): Phospho-proteomic analysis of mantle cell lymphoma cells suggests a pro-survival role of B-cell receptor signaling. *Cellular Oncology* 34:141–53.

Pinyol, M., Hernandez, L., Cazorla, M., Balbín, M., Jares, P., Fernandez, P.L., Montserrat, E., Cardesa, A., Lopez-Otín, C., Campo, E. (1997): Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 89:272–80.

Pott, C., Hoster, E., Delfau-Larue, M.H., Beldjord, K., Böttcher, S., Asnafi, V., Plonquet, A., Siebert, R., Callet-Bauchu, E., Andersen, N., van Dongen, J.J., Klapper, W., Berger, F., Ribrag, V., van Hoof, A.L., Trneny, M., Walewski, J., Dreger, P., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Kneba, M., Kluin-Nelemans, H.C., Hermine, O., Macintyre, E., Dreyling, M. (2010): Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood*. 115(16):3215-23.

Pott, C., Schrader, C., Gesk, S., Harder, L., Tiemann, M., Raff, T., Brüggemann, M., Ritgen, M., Gahn, B., Unterhalt, M., Dreyling, M., Hiddemann, W., Siebert, R., Dreger, P., Kneba, M. (2006): Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphoma. *Blood*. 107(6):2271-8.

Quintanilla-Martinez, L., Vries-Hill, T., Fend, F., Calzada-Wack, J., Sorbara, L., Campo, E., Jaffe, E.S., Raffeld, M. (2003): Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. *Blood* 101:3181–7.

Rajewsky, K. (1996): Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 381:751–8.

Rodig, S.J., Shahsafaei, A., Li, B., Mackay, C.R., Dorfman, D.M. (2005): BAFF-R, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Human Pathology* 36:1113–9.

Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., Goeddel, D.V. (1995): The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83:1243–52.

Ruzinova, M.B., Caron, T., Rodig, S.J. (2010): Altered subcellular localization of c-Myc protein identifies aggressive B-cell lymphomas harboring a c-MYC translocation. *Am. J. Surg. Pathol.* 34:882–91.

Szczepański, T., Willemse, M.J., Brinkhof, B., van Wering, E.R., van der Burg, M., van Dongen, J.J. (2002): Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood*. 99(7):2315–23.

Ueda, C., Akasaka, T., Kurata, M., Maesako, Y., Nishikori, M., Ichinohasama, R., Imada, K., Uchiyama, T. & Ohno, H. (2002): The gene for interleukin-21 receptor is the partner of BCL6 in t(3;16) (q27;p11), which is recurrently observed in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 21: 368–376.

Vaandrager, J.W., Schuurin, E., Zwikstra, E., de Boer, C.J., Kleiverda, K.K., van Krieken, J.H., Kluin-Nelemans, H.C., van Ommen, G.J., Raap, A.K., Kluin, P.M. (1996): Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 88:1177–82.

van der Velden, V., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, J.J. (2003): Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17:1013– 34.

van der Velden, V.H., Cazzaniga, G., Schrauder, A., Hancock, J., Bader, P., Panzer-Grumayer, E.R., Flohr, T., Sutton, R., Cave, H., Madsen, H.O., Cayuela, J.M., Trka, J., Eckert, C., Foroni, L., Zur Stadt, U., Beldjord, K., Raff, T., van der Schoot, C.E., van Dongen, J.J.; European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL) (2007): Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 21(4):604-11.

van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Brüggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuuring, E., García-Sanz, R., van Krieken, J.H., Droese, J., González, D., Bastard, C., White, H.E., Spaargaren, M., González, M., Parreira, A., Smith, J.L., Morgan, G.J., Kneba, M., Macintyre, E.A. (2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. (12): 2257-317.

van Dongen, J.J., Wolvers-Tettero, I.L. (1991): Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta*. 198:1-91.

Wagner, S.D., Ahearne, M., Ferrigno, P.K. (2011): The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy. *British Journal of Haematology* 152: 3–12.

Wang, D., You, Y., Lin, P.C., Xue, L., Morris, S.W., Zeng, H., Wen, R., Lin, X. (2007): Bcl10 plays a critical role in NFkappaB activation induced by G protein-coupled receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104: 145–150.

Wotherspoon, A.C., Doglioni, C., Diss, T.C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M., Isaacson, P.G. (1993): Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342:575-7.

Yang, Z.Z., Novak, A.J., Stenson, M.J., Witzig, T.E., Ansell, S.M. (2006): Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107:3639–46.

Yasunaga, J., Matsuoka, M. (2007): Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. *Cancer Control*. 14(2):133-40.

## 9. SEZNAM PŘÍLOH

<p><b>Prekursorové lymfoidní neoplasie</b>  B-lymfoblastická leukemie/lymfom, blíže neurčená (B-ALL/LBL)  T-lymfoblastická leukemie/lymfom (T-ALL/LBL)</p> <p><b>Zralé B-lymfomy</b>  Chronická lymfocytární leukemie/malobuněčný lymfocytární lymfom (CLL/SLL)  B-prolymfocytární leukemie (B-PLL)  Splenický lymfom z B-buněk marginální zóny (SMZL)  Leukemie z vlasatých buněk (HCL)  Splenický lymfom/leukemie, blíže neurčený  Splenický difúzní B-lymfom červené pulpy  Variantní leukemie z vlasatých buněk (vHCL)  Lymfoplasmocytický lymfom (LPL)  Waldenströмова makroglobulinemie  Nemoc z těžkých řetězců, blíže neurčená (HCD <math>\alpha</math>, <math>\gamma</math>, <math>\mu</math>)  Plasmocelulární neoplasie  Monoklonální gamapatie neurčitého významu (MGUS)  Plasmocytární myelom  Plasmocytom  Solitární plasmocytom kosti  Extraoseální plasmocytom  Extranodální lymfom z marginální zóny slizniční lymfoidní tkáně (MALT)  Uzlinový lymfom z marginální zóny (MNZL)  Folikulární lymfom (FL)  Primární kožní lymfom folikulárního centra (PCFCL)  Lymfom z plášťových buněk (MCL)  Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL)  Velkobuněčný B-lymfom bohatý na T-lymfocyty a histiocyty (THRBCL)  Primární DLBCL centrálního nervového systému  Primární kožní DLBCL, „leg type“  EBV-positivní DLBCL vyššího věku  DLBCL spojený s chronickým zánětem  Lymfomatooidní granulomatoza  Primární mediastinální (thymický) velkobuněčný B-lymfom (PMBL)  Intravaskulární velkobuněčný B-lymfom</p>	<p>ALK-positivní velkobuněčný B-lymfom  Plasmoblastický lymfom  Velkobuněčný B-lymfom vznikající v HHV8-asociované multi-centrické Castlemanově nemoci  Primární exsudativní lymfom (PEL)  Burkittův lymfom (BL)  B-lymfom s rysy intermediárními mezi DLBCL a BL  B-lymfom s rysy intermediárními mezi DLBCL a CHL</p> <p><b>Zralé T- a NK-lymfomy</b>  T-prolymfocytická leukemie (T-PLL)  Leukemie z velkých granulárních T-lymfocytů (T-LGL)  Chronická lymfoproliferativní onemocnění z NK-buněk  Agresivní leukemie z NK-buněk  Systémové EBV-positivní T-lymfoproliferativní onemocnění dětského věku  Lymfom vzhledu hydroa vacciniiforme  Adultní T-leukemie/lymfom (ATLL)  Extranodální NK/T-lymfom, nasální typ  Enteropatický T-lymfom (EATL)  Hepatosplenický T-lymfom (HSTL)  Podkožní panikulitický T-lymfom (SPTCL)  Mycosis fungoides (MF)  Sézaryho syndrom (SS)  Primární kožní CD30-positivní T-lymfoproliferace  Lymfomatooidní papulosa  Primární kožní anaplastický velkobuněčný lymfom (C-ALCL)  Primární kožní gama/delta T-lymfom  Primární kožní CD8-positivní agresivní epidermotropický cytotoxický T-lymfom  Primární kožní CD4-positivní T-lymfom z menších a středně velkých buněk  Periferní T-lymfom, blíže neurčený (PTCL, U)  Angioimunoblastický T-lymfom (AITL)  Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) ALK-positivní  Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) ALK-negativní</p>
---	---

### Příloha č. 1 Přehled klasifikace WHO (2008) lymfoidních neoplázií.<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/prolymfocytarni-leukemie-458623> [online]. [cit. 2012-04-12].



Parametr		
<b>Incidence</b>		
Počet/100 tis. obyvatel (rok 2006)	Muži:	11,5
	Ženy:	10,2
Absolutní počet nových onemocnění (rok 2006)	Muži:	578
	Ženy:	539
Podíl ze všech malignit (rok 2006)	Muži:	1,6 %
	Ženy:	1,7 %
Trend za období 2000–2006	Muži:	rostoucí
	Ženy:	rostoucí
Typický věk nemocných (25–75 % kvantil)	Muži:	53–74 let
	Ženy:	56–77 let
Výskyt muži:ženy		1,06:1
<b>Mortalita</b>		
Úmrtí/100 tis. obyvatel (rok 2006)	Muži:	5,0
	Ženy:	4,6
Podíl na celkové mortalitě (rok 2006)	Muži:	0,48 %
	Ženy:	0,47 %
Podíl na mortalitě na novotvary (rok 2006)	Muži:	1,62 %
	Ženy:	1,92 %
Trend za období 2000–2006		stabilizovaný

**Příloha č. 2 Základní epidemiologické charakteristiky NHL v ČR k roku 2006 (data Národního onkologického registru České republiky). Převzato z Papajík et al., 2009.**

Diagnóza	Zastoupení mezi všemi lymfomy	Diagnóza	Zastoupení
Difuzní velkobuněčný B-lymfom	30,6 %	Prekurzorová T-lymfoblastická leukemie/lymfom	1,7 %
Folikulární lyfom	22,1 %	Periferní T-buněčné lymfomy vyjma anaplastického lymfomu Nazální NK/T-lymfom 1,4 % Angioimunoblastický T-lymfom 1,2 % Enteropatický T-lymfom < 1 % Hepatosplenický T-lymfom < 1 % T-buněčná leukemie/lymfom dospělých < 1 %	7,6 %
MALT lyfom	7,6 %	Anaplastický velkobuněčný T/null lyfom	2,4 %
Chronická B-lymfatická leukemie/lymfocytární lyfom	6,7 %		
Lymfom v plášťové zóny ( <i>mantle cell lymphoma</i> )	6,0 %		
Mediastinální velkobuněčný B-lymfom	2,4 %		
Anaplastický velkobuněčný B-lymfom	2,4 %		
Burkittův lyfom	2,5 %		
Nodální lyfom marginální zóny	1,8 %		
Prekurzorový B-lymfoblastický	1,7 %		
Lymfoplazmocytární lyfom	1,2 %		
Ostatní typy .....		3,3 %	

**Příloha č. 3 Přehled a jednotlivé zastoupení maligních lymfomů. Převzato z Jaffe, 2001.**

NHL histological type	Translocations observed	Cases affected	Proto-oncogene involved	Mechanism behind proto-oncogene activation	Proto-oncogene function
Lymphoplasmacytic lymphoma	t(9;14)(p13;q32)	50%	PAX5	Transcriptional deregulation	Transcription factor regulating B cell proliferation and differentiation Negative regulator of apoptosis
Follicular lymphoma	t(14;18)(q32;q21) t(2;18)(p11;q21) t(18;22)(q21;q11)	80–90%	BCL2	Transcriptional deregulation	
Mantle-cell lymphoma	t(11;14)(q13;q32)	70%	BCL1/cyclin D1	Transcriptional deregulation	Cell-cycle regulator
MALT lymphoma	t(11;18)(q21;q21)	50%	API2/MLT	Fusion protein	Antiapoptosis
Diffuse large B-cell lymphoma	t(1;14)(p22;q32) der(3)(q27)	Rare 35%	BCL10 BCL6	Transcriptional deregulation	Antiapoptosis? Transcriptional repressor
Burkitt's lymphoma	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p11;q24) t(8;22)(q24;q11)	80% 15% 5%	c-MYC	Transcriptional deregulation	Transcription factor regulating proliferation and growth
Anaplastic large T-cell lymphoma	t(2;5)(p23;q35)	60% adult, 85% childhood	NPM/ALK	Fusion protein	ALK is a tyrosine kinase

Příloha č. 4 Přehled některých NHL s podrobnou molekulární charakteristikou.  
Převzato z Harris et al., 2001.